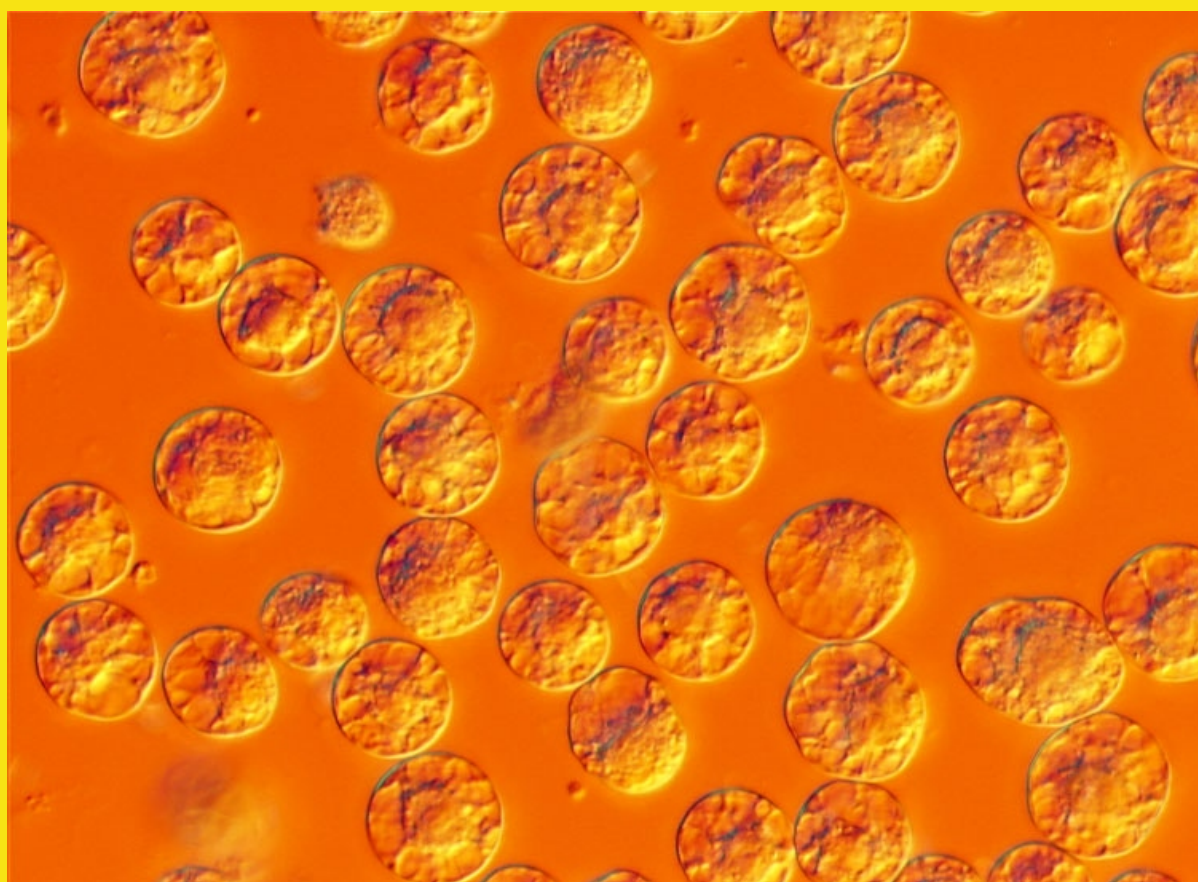


PROGRAM KNIHA ABSTRAKT

3. METODICKÉ DNY

**Žďárské vrchy - Milovy
20. - 24. října 2003**



**Česká společnost experimentální biologie rostlin
Ústav experimentální botaniky AV ČR**

ÚVODNÍ SLOVO KE 3. METODICKÝM DNŮM

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

vítám Vás na třetím pokračování sympozia, které se „věnuje metodám používaným v rostlinné experimentální biologii“. Uvozovky jsou použity proto, že to není tak úplně pravda, i když takový byl náš cíl. Stejně jako v případě ročníku předcházejícího, i tentokrát jsme se snažili zařadit do programu především přednášky špičkových odborníků bez ohledu na to, pracují-li s rostlinami či s jinými organismy. Je to jeden z přístupů, který zůstal zachován a který se nám zdá dobrý.

I některé další přístupy v organizaci Metodických dnů jsme zopakovali. Plenární přednášky výše zmíněných odborníků jsme doplnili přednáškami z řad účastníků. I tentokrát najdete v programu sekci „Z jiných světů“ a dle stejného schématu bylo vybráno i místo konání. Jen je zase trochu blíže Praze (snad lépe řečeno, je poněkud západněji). Vhodných míst totiž není mnoho (nebo o nich nevíme) a tak, pokud Metodické dny ještě „chvilí“ vydrží, máte vy, kteří se účastníte pravidelně, naději objet časem celou republiku.

Zůstala i řada lidí v organizačním výboru. Toho si velmi vážím. Velkou radost mám též ze skutečnosti, že se našla řada nových kolegů, kteří byli ochotni se na organizaci tohoto sympozia podílet. Obával jsem se totiž, že v dnešním světě, ve kterém nikdo nemá čas, bude organizování takovýchto setkání čím dál tím obtížnější a že lidí, kteří budou ochotni se na takovéto neimpaktované činnosti podílet, bude stále méně. Východiskem by snad bylo vytvoření jakéhosi „sympoziálního kitu“, který by se jen rozbalil a dle přiloženého protokolu by se postupovalo vpřed až k pěknému výsledku. Stabilizací výše zmíněných přístupů v organizaci Metodických dnů vlastně již takovýto kit tvoříme, zatím je však třeba stále ještě spoléhat na jednotlivé lidi.

Jsem tedy velmi rád, že se našlo dostatek lidí, ochotných podílet se na přípravě tohoto setkání, jsem neméně rád, že existuje řada odborníků, kteří bez váhání přislíbili svoji aktivní účast a jsem šťasten, že je dostatek těch, kteří mají o tuto akci zájem a bez kterých by se vůbec nekonala.

Těším se na setkání s Vámi.

V Praze dne 31.8.2003

Za organizační výbor



Jan Martinec

Pozn.: Obsahem této knihy abstrakt jsou abstrakty přednášek a plakátových sdělení. Jednotlivé příspěvky jsou publikovány tak, jak byly dodány autory.

VĚDECKÁ RADA SYMPOZIA

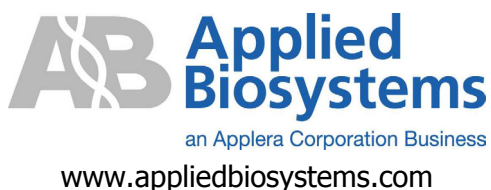
Miroslav Kamínek (ÚEB AVČR)
Aleš Kovařík (BFÚ AVČR)
Jan Bartoš (ÚEB AVČR)
Jan Macas (ÚMBR AVČR)
Jan Martinec (ÚEB AVČR)
Zdeněk Opatrný (PřFUK)
Jan Petrášek (ÚEB AVČR, PřFUK)
Olga Valentová (VŠCHT Praha)
Eva Zažímalová (ÚEB AVČR)

ORGANIZAČNÍ VÝBOR

Tomáš Feltl
Aleš Kovařík
Jan Linek
Jan Martinec
Přemysl Pejchar
Jan Petrášek
Martin Potocký
Olga Štajnrtová

Další informace najdete na www.ueb.cas.cz/methods

SYMPOZIUM SE KONÁ DÍKY FINANČNÍ PODPOŘE TĚCHTO FIREM:



OBSAH

Program.....	2
Abstrakty přednášek.....	7
Abstrakty plakátových sdělení.....	47
Rejstřík autorů.....	77
Seznam účastníků.....	79
Poznámkový blok.....	88
Hodnotící listy (určeno k vyplnění, vytržení a odevzdání)	
Obsah Knihy abstrakt a Biologických listů 68 (3)/2003 na CD....zadní obálka	

PROGRAM

Pondělí 20.10.2003

16.00-19.30 *Registrace*

18.30-19.30 **Večeře**

19.30-19.45 *Zahájení sympozia*

*Sekce: **Z jiných světů***

19.45-21.00 S. Komárek: *Jak moc zkušenostní vědou je dnešní biologie?* 8

Noční kino

21.30 **Mrtvý muž (režie: Jim Jarmusch; hudba: Neil Young)**

Úterý 21.10.2003

7.30 - 8.15 Registrace

Sekce: Bioinformatika

Předseda: J. Macas

8.15- 9.00	J. Pačes: <i>Počítačová analýza genomů</i>	9
9.00- 9.45	J. Kypr: <i>Bioinformatika molekul DNA lidského genomu</i>	10
9.45-10.15	Přestávka, prezentace firem	
10.15-11.00	I. Kadlecová: <i>Informační zdroje pro výzkum a vývoj</i>	11
11.00-11.20	A. Kovařík: <i>Programy pro analýzu nukleových kyselin</i>	12
11.20-11.40	D. Pícková: <i>Strategie genotypování inzerčních mutantů Arabidopsis thaliana</i>	13
12.00-13.30	Oběd	

Sekce: Z jiných světů

13.30-14.15	J. Fischer: <i>Nestandardní způsoby využití a zneužití vědy</i>	14
-------------	---	----

Sekce: Bioinformatika

Předseda: A. Kovařík

14.15-15.00	M. Potocký: <i>Použití bioinformatiky v rostlinné biologii - analýza proteinových sekvencí</i>	15
15.00-15.45	F. Cvrčková: <i>Analýza velkých genových rodin aneb o čem vypovídá homologie?</i>	16
15.45-16.15	Přestávka, prezentace firem	
16.15-17.00	J. Macas: <i>Identifikace mobilních elementů v genomických sekvencích rostlin pomocí počítačových analýz</i>	17
17.00-17.20	D. Honys: <i>Metody studia gametofytických transkripčních faktorů v postgenomové éře</i>	18
17.20-17.40	D. Reňák: <i>Regulace transkripce in silico</i>	19
17.40-18.00	J. Fišer: <i>TILLING - reverzní genetikou k porozumění funkce genů</i>	20
18.30-19.30	Večeře	

Noční kino

21.00 Ptáci svět (režie: J. Perrin, J. Cluzaud, M. Debats)

Středa 22.10.2003

Sekce: **Modelové organismy (přednosti a omezení)**

Předseda: Z. Opatrný

8.15 - 9.00	B. Vyskot: <i>Modely vývojové biologie rostlin</i>	21
9.00 - 9.45	B. Brzobohatý: <i>Arabidopsis thaliana jako nástroj identifikace funkce rostlinných genů</i>	22
9.45-10.15	Přestávka, prezentace firem	
10.15–10.50	J. Hejátko: <i>Inzerční mutageneze ve funkční genomice Arabidopsis thaliana</i>	23
10.50-11.35	J. Petrášek: <i>Buněčné kultury vyšších rostlin</i>	25
12.00-13.30	Oběd	
14.00-17.00	<i>Exkurze - Políčka, Zelená hora</i>	
18.00-19.30	Plakátová sekce	
19.30	Společenská večeře	

Čtvrtek 23.10.2003

Sekce: O „nomech“ v praxi (genom, transkriptom, proteom)

Předseda: M. Potocký

8.15-9.40	P. Šebo: <i>Postgenomické přístupy ke studiu genové exprese - technologie DNA microarray - možnosti a využití</i>	26
9.40-10.00	J. Fulneček: <i>Identifikace a izolace cDNA funkčně homologních genů.....</i>	27
10.00-10.30	Přestávka, prezentace firem	
10.30-10.50	H. Štorchová: <i>Použití SMART technologie přípravy cDNA při práci s rostlinným materiálem</i>	28
10.50-11.10	E. Sýkorová: <i>Využití metod slot-blot hybridizace pro screening sekvencí v rostlinných genomech.....</i>	29
11.10-11.30	M. Fojtová: <i>Studium transgenní RNA.....</i>	31
11.30-11.50	J. Janda: <i>Konstrukce chromozomově specifických BAC knihoven u rostlin.....</i>	32
11.50-12.10	R. Hobza: <i>Od mikrodisekce k mapování struktury genomu</i>	33
12.10-12.30	V. Hykelová: <i>Genetické mapování jako nástroj ke studiu evoluce pohlavních chromosomů rodu Silene</i>	33
12.30-14.00	Oběd	

Sekce: Z jiných světů

14.00-14.20	J. Tomancová: <i>Forenzní botanika.....</i>	34
14.20-14.40	H. Eliášová: <i>Mykotická poškození trichologického materiálu.....</i>	35

Sekce: O „nomech“ v praxi (genom, transkriptom, proteom)

Předseda: J. Martinec

14.45-15.30	J. Weiser: <i>Proteomika – principy, metody a aplikace.....</i>	36
15.30-15.50	B. Bavlínka: <i>Kvasinkový dvouhybridní systém.....</i>	37
15.50-16.05	T. Hájek: <i>Rychlá izolace rostlinných mitochondrií z malého množství výchozího materiálu pro analýzu proteinů</i>	38
16.05-16.35	Přestávka, prezentace firem	
16.35-16.50	K. Skalická: <i>Konstrukce syntetického tabáku.....</i>	39
16.50-17.05	R. Matyášek: <i>Způsoby detekce polymorfismu homologních DNA a jejich využití při studiu změn ve struktuře rodičovských genomů u modelových allotetraploidních druhů rodu Nicotiana a Tragopogon.....</i>	39
17.05-17.50	J. Schraml: <i>LC-NMR - principy a použití.....</i>	40
18.00-19.00	Večeře	

Noční kino

20.00 Shrek (režie: Andrew Adamson)

Hudba k tanci

22.00 DJ Jerry

Pátek 24.10.2003

Sekce: Moderní metody studia buněčných struktur

Předseda: J. Petrášek

8.15-9.00	J. Bartoš: <i>Analýza genomu rostlin pomocí průtokové cytometrie</i>	41
9.00-9.45	L. Kubínová: <i>Dvoufotonová konfokální mikroskopie.....</i>	42
9.45-10.15	Přestávka, prezentace firem	
10.15-11.00	P. Hozák: <i>Moderní metody elektronové mikroskopie.....</i>	43
11.00-11.20	Peter Illéš: <i>Mikroskopické metody sledovania príjmu a akumulácie hliníka v koreňoch Arabidopsis thaliana.....</i>	44
11.20-11.40	K. Mlíčková: <i>Histochemické metody stanovení patologických změn v listech rostlin v průběhu patogeneze biotrofních houbových parazitů.....</i>	45
11.40-11.55	E. Šimáňová: <i>Nová metoda měření propustnosti průduchové kutikuly izolované z listů břečťanu (Hedera helix L.).....</i>	46
11.55	Zakončení sympozia, vyhlášení výsledků soutěže	
12.00	Oběd	

ABSTRAKTY PŘEDNÁŠEK

Jak moc zkušenostní vědou je dnešní biologie?

STANISLAV KOMÁREK

PřF UK, Katedra zoologie, Viničná 7, 128 44 Praha 2

Tel.: 221 953 208, e-mail: komarek@natur.cuni.cz

Ač se novověká věda ve svých počátcích chápala právě jako zkušenostní a na empirii kladla extrémní důraz, ve svých důsledcích se stává v posledku metafyzikou hmotného světa, která zkušenosti nejen neodpovídá, ale přímo jí odporuje (zrání jablka pociťujeme jako kvalitativní změnu jeho barvy, chuti, tvrdosti atd., nikoli jako přeskupování v posledku neměnných atomů v rámci jeho chemismu). V biologii šel tento proces nejdříve cestou "prodlužování" přírodních typů smyslového vnímání (mikroskopie), posléze se stala naukou o skrytých entitách za jevovým "závojem Mája" - učebnice botaniky pro odborníky je plná strukturních vzorců, pro laiky fotografií květin - zasvěcenci "vědí své" o světě, který je skrytý, jako býval "onen svět" tradičních náboženství.

Počítačová analýza genomů

JAN PAČES^{1,2}

¹Ústav molekulární genetiky AVČR a ²Centrum integrované genomiky, Flemingovo nám. 2, 16637 Praha 6 - Dejvice.

Tel.: 220183446, e-mail: hpaces@img.cas.cz

Současná genomika je založena na analýze celých genomů nebo velkých úseků DNA, například megaplasmidů, chromosomů apod. Předpokladem úspěšné analýzy je stanovení nepřerušované a přesné nukleotidové sekvence analyzované DNA. Nukleotidové sekvence je analyzována na přítomnost genů a dalších funkčních úseků, zejména řídících a regulačních elementů, a též na charakter nukleotidových sekvencí, které nemají přímý funkční význam. Jsou to např. pseudogeny, repetitivní sekvence v eukaryotických genomech, cizorodá integrovaná DNA. Důležitou součástí genomiky je přiřazení funkce jednotlivým genům a regulačním elementům. Například až čtvrtina genů v bakteriálních genomech nemá dosud známou funkci. Dalším úkolem genomiky je studium exprese jednotlivých genů, např. v chorobných stavech a při diferenciaci buněk. K tomu se dnes využívá metod založených na současné analýze velkého počtu genů. Je to zejména čipová technologie. Velmi důležitá je komparativní genomika, obor, v němž se srovnávají velké soubory genů a negenové oblasti přítomné v různých organizmech. Srovnávají se blízké příbuzné organizmy, ale i velice vzdálené organizmy, např. bakterie a obratlovci včetně člověka. Srovnání vede nejen k identifikaci funkce genů, ale též k poznatkům o molekulárních mechanismech evoluce. Bioinformatika v širším slova smyslu vytváří nástroje pro zpracování velkého množství dat, která jsou generována vysokokapacitními genomickými metodami. V užším slova smyslu pak bioinformatika extrahuje molekulární informační systém buňky a generuje hypotézy vhodné k testování klasickými metodami.

Bioinformatika molekul DNA lidského genomu

JAROSLAV KYPR

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 61265 Brno, ČR

Tel.: 541517198, e-mail: kypr@ibp.cz

Přelom 20. a 21. století je spojen se stanovením více než 80% nukleotidových posloupností obsažených ve 24 molekulách DNA tvořících jaderný lidský genom. To umožňuje zkoumat lidský genom způsobem, který dříve nebyl možný. Současně si tato nová informace vynucuje rozvoj bioinformatiky jako vědní disciplíny, která se zabývá shromažďováním, tříděním a počítačovou analýzou biologických informací.

V přednášce budou prezentovány některé výsledky získané autorem a jeho spolupracovníky v oblasti bioinformatiky v období 1987-2003. Bude ukázáno, že po stránce věcného obsahu bioinformatika existovala dávno před tím než pro ni bylo přijato toto jméno, protože počítačové analýzy nukleotidových posloupností celých genomů byly prováděny již v osmdesátých letech minulého století. Jediným podstatným rozdílem oproti současné situaci je tehdejší používání virových genomů (bakteriofág lambda nebo retroviry relevantní k AIDS) k tomuto účelu, protože kompletní nukleotidové posloupnosti bakteriálních a eukaryontních genomů byly k dispozici až mnohem později.

Bude ukázáno, že genom viru HIV je bohatý na adenin, jehož přebytek se v něm vyskytuje na úkor cytosinu, zatímco v HTLV je tomu právě naopak. Na základě korelací rozložení nukleotidů ukážeme, že lidský genom je mozaikou dvou typů segmentů délky až desítek kilobází, které se pravděpodobně liší převažujícím typem mutací. S využitím databáze krystalových struktur oligonukleotidů NDB a genomových posloupností nukleotidů EMBL jsme navrhli postup simulace prostorových struktur molekul DNA tvořících lidský genom. Ukázali jsme, že mikrosatelity jsou připojeny k okolní genomové DNA prostřednictvím konektorů nezanedbatelné délky. Výskyt mikrosatelitů v genomech dramaticky závisí na jejich primární struktuře. Záměna již jediného nukleotidu vede často ke změnám výskytu až o dva řády. Byla zkoumána homogenita rozložení (G+C) v genomech a bylo zjištěno, že homogenní oblasti se v nich prakticky vůbec nevyskytují. To je v rozporu s představou o izochórách, které jsou dominantním konceptem teorie o strukturách dalekého dosahu v lidském genomu.

Kypr J., Mrázek J.: 1987 – Nature 327: 20

Kypr J., Mrázek J., Reich J.: 1989 – BBA 1009: 280-282

Haring D., Kypr J.: 1999 – J.Theor.Biol. 201: 141-156

Haring D., Kypr J.: 1999 - JBSD 17: 267-273

Matula M., Kypr J.: 1999 - JBSD 17: 275-280

Haring D., Kypr J.: 2001 - BBRC 272: 571-575

Haring D., Kypr J.: 2001 - BBRC 280: 567-573

Haring D., Kypr J.: 2001 - Mol.Biol.Rep. 28: 9-17

Hanzálek P., Kypr J.: 2001 - BBRC 283: 219-223

Hrabcová I., Kypr J.: 2003 - BBRC 300: 824-831

Podporováno granty GAAVČR IAA1004201 a IGA MZ ČR NM7634-3/2003.

Informační zdroje pro výzkum a vývoj

IVANA KADLECOVÁ

Knihovna Akademie věd České republiky, Národní třída 3, 115 22 Praha 1

Tel.: 224 24 05 24, e-mail: kadlec@lib.cas.cz

Klasické a moderní zdroje, tradiční a novodobé nosiče. Od klasických katalogů k portálům.

Modely akvizice a zpřístupňování informačních zdrojů. Konsorcia v Čechách. Finanční zdroje. Klady a úskalí.

Konkrétní ukázky informačních zdrojů dnes a u nás v Čechách.

Programy pro analýzu nukleových kyselin

ALEŠ KOVAŘÍK

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř molekulární epigenetiky, Královopolská 135, 61265 Brno

Tel.: 541517179, e-mail: kovarik@ibp.cz

V současnosti genomické projekty probíhající na celém světě generují značný objem dat. Řádově přichází do databází každou minutu jedna nová nukleotidová či proteinová sekvence. Například největší databáze GenEMBL obsahuje již přes dvacet miliard nukleotidových bází. Je zřejmé, že bez výpočetní techniky se zpracování těchto primárních informací neobejde. Úkolem bioinformatiky je analyzovat sekvenční data, odhalovat na základě současných biochemických a biofyzikálních znalostí jejich strukturní, funkční a evoluční význam. Zdá se, že kormidelník Microsoftu Bill Gates měl pravdu, když před mnoha léty prohlásil, že Internet se stane klíčovým médiem pro sekvenční "bioinformace", dnes již prakticky využívané v medicíně a biotechnologiích. V přednášce bude pojednáno o metodách vyhledávání nukleotidových sekvencí a jejich další analýze.

Seznam užitečných webovských stránek s databázemi a programy pro sekvenční analýzu

Název	Adresa	Charakteristika
National Centre for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Databáze: DNA, proteiny, celé genomy, chromozomy (GenBank, EMBL, DDBJ, SwissProt), MMDB Literatura: National Library of Medicine Programy: Blast Další užitečné odkazy
EBI	http://www.ebi.ac.uk/	Databáze: EMBL, GenBank, DDJB, SwissProt
TAIR	http://www.arabidopsis.org/	Databáze: genom Arabidopsis thaliana
Stanford Genomic	http://genome-www.stanford.edu/	Databáze: genom Saccharomyces cerevisiae
Stanford Human Genome Center	http://shgs.stanford.edu/	Databáze: lidský genom
TIGR Databases	http://www.tigr.org/tdb/	Mikrobiální genomy, část genomu Arabidopsis thaliana a rýže
Genomatix	http://www.genomatix.de/	Software pro analýzu promotorů
ExPASy Molecular Biology Server	http://us.expasy.org/	Server zaměřený na analýzu bílkovin. Proteinové databáze, proteomický software, užitečné nástroje
PCR_Yale_University	http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html	Vše o PCR, užitečné nástroje a odkazy
Český národní uzel	http://www.ICCBnet.cz/	Propojuje bioinformační centra Databáze: GenBank, EMBL, DDJB, SwissProt – aktualizované 1x14 dní Software: Wisconsin GCG package (pro pokročilejší – běží pod UNIX)
Clustal	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/	Program na porovnávání homologií DNA, proteinů – pro pokročilejší
Tandem repeats finder	http://c3.biomath.mssm.edu/trf.submit.options.html	Program pro vyhledávání repetitivních v DNA
TRADAT	http://www.itba.mi.cnr.it/tradat/	Transcription Databases and Analysis Tools
BEND.IT	http://www2.icgeb.trieste.it/~dna/bend_it.html	Software: struktura DNA, základní parametry dvoušroubovice
Wisconsin Package	http://www.gcg.com/	Univerzální software pro analýzu sekvenčních data (není zadarmo)

Literatura: Introduction to Bioinformatics. (1999) Eds. Attwood TK& Parry-Smith DJ. Pearson Education limited, Harlow, England. ISBN 0 582 327881

Strategie genotypování inzerčních mutantů *Arabidopsis thaliana*.

DENISA PÍCKOVÁ^{1,2}, HANA SOUKUPOVÁ²

¹ Katedra fyziologie rostlin PřF UK, Viničná 5, 12844 Praha 2, ČR

² ÚEB AVČR, Rozvojová 135, 16 02 Praha 6 – Lysolaje, ČR

Tel.: 220390449, e-mail: pickova@ueb.cas.cz

Důležitým nástrojem reverzní genetiky je inzerční mutagenese založená na vložení cizorodé DNA do daného genu, který je tím částečně či úplně vyřazen z funkce. V případě *Arabidopsis* se nejčastěji používá modifikovaná T-DNA nesoucí selekční marker, která oproti transpozónům zaručuje stabilní mutagenesi po několika generacích a do genomu se včleňuje v malém počtu kopií.

Vytvoření vlastní sbírky inzerčních mutantů je poměrně náročné, i když má své výhody (např. získání mutantů se stejným fenotypem). V současnosti je nejsnazší získat inzerční mutanty z několika databází, které obsahují řádově desítky tisíc linií a pokrývají tak téměř celý genom *Arabidopsis*. Při výběru mutantní linie je důležité přihlídnout k umístění inzertu v rámci genu, především kvůli předpokládanému efektu inserce na jeho funkci, i k následnému genotypování.

Pro detekci přítomnosti inzertu v linii se využívá metoda PCR s dvojicí primerů, z nichž jeden je odvozen ze sekvence vektoru a druhý z genomu. Pomocí této metody lze také rozlišit homozygoty a heterozygoty v dané inserci. PCR metodu však nelze použít ke zjištění dalších nezávislých inzercí ve sledované linii, jejichž fenotypový projev může náhodně interferovat s mutací ve sledovaném genu. Vzhledem k častému výskytu silencingu genu kódujícího selekční marker lze (ačkoliv obtížně) požadovanou linii získat pomocí zpětného křížení při předpokladu nezávislé segregace inzercí. Další možností je ověření za pomoci Southern blottingu a plasmid rescue. Pro charakterizaci mutantu je nezbytné ověřit úroveň exprese daného genu pomocí RT-PCR.

Podporováno grantem: GAČR 204/02/1461 a výzkumným centrem MŠMT SIDROS (LN 00A081).

Nestandardní způsoby užití a zneužití vědy

JAN FISCHER

Fyzikální ústav Akademie věd České republiky, Praha

1. Standardní způsoby užití a zneužití vědy. Motivy k vědecké práci.
2. Zrod moderní vědy. Galilei a jeho předchůdci. Pochopení a předpověditelnost.
3. Kanonizace fyzikálního výzkumu. Složenost, redukcibilita a redukcionismus.
4. Dobývání pravdy o světě. Jak je zaručeno, že vědecké poznání směřuje k pravdivému obrazu o světě.
5. Problém přenosnosti metod fyzikálního výzkumu na jiné obory: extrémní podmínky, množství nevratných dějů, univerzalita poruchového počtu.
6. Popularizace a medializace vědy a jejich úskalí.
7. Výhled do budoucnosti: masovost vědecké činnosti, vize a hrozba.
8. Vědecká metoda a její deformace. Obrácená úloha vědeckého poznání: analogie s právem a jinými činnostmi člověka.

Použití bioinformatiky v rostlinné biologii - analýza proteinových sekvencí

MARTIN POTOCKÝ

Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha

Tel.: 221 951 685, e-mail: potockym@vscht.cz

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 239

Analýza velkých genových rodin aneb o čem vypovídá homologie?

FATIMA CVRČKOVÁ

Katedra fyziologie rostlin PŘF UK, Viničná 5, Praha 2, ČR

Tel.: 221951685, e-mail: fatima@natur.cuni.cz

Dendrogramy čili „stromy“ vyjadřující rekonstruované evoluční osudy genových rodin se v posledních letech staly téměř povinnou ozdobou publikací zaměřených na charakterizaci rostlinných genů. Kvalita publikovaných výsledků je však někdy i v jinak solidních pracích sporná. V přednášce budou na konkrétním příkladu analýzy rodiny rostlinných forminů demonstrovány postupy konstrukce dendrogramů, běžné problémy technického i interpretačního rázu a způsoby, jak se jim vyhnout.

Demonstrováné softwarové nástroje jsou vesměs dostupné buď zcela volně, nebo zdarma po registraci. Odkazy na příslušné www stránky lze najít např. na

<http://kfrserver.natur.cuni.cz/bioinfo.html>

Zásadním pravidlem je, že *dendrogram nemůže být lepší než data, na kterých je založen.*

Kritickými body zde jsou zejména:

- *Identifikace genů, které mají být zařazeny do analýzy.* Nestačí spoléhat pouze na dříve rozpoznané a tedy anotované geny a hledání v sekvencích predikovaných proteinů, k vyhledávání dosud neznámých homologů známých genů je vhodné použít metody založené na prohledávání nukleotidových databází proteinovou „sondou“ (TBLASTN).
- *Predikce struktury genových produktů.* Anotace kompletních genomů bývají často založeny na kombinaci experimentálně zjištěných kompletních cDNA sekvencí a automaticky generovaných teoretických predikcí sestřihu mRNA, které jsou známé svou náchylností k chybám (Haas et al. 2002). Často lze k verifikaci genové struktury a k případnému odhalení chyb v genomových sekvencích využít parciálních sekvencí z databází EST (Haas et al. 2003).
- *Kvalita alignmentu.* Zde odkazují na předchozí přednášku M. Potockého.
- *Selekce úseků alignmentu pro konstrukci dendrogramu.* Nutno mít na paměti předpoklady, z nichž vycházejí používané metody výpočtu evoluční vzdálenosti. Pokud umíme počítat pouze se záměnovými mutacemi, mezery nejsou data!
Dalšími významnými faktory při konstrukci důvěryhodných dendrogramů jsou:
- *Volba metody.* Cenu dendrogramu výrazně zvýší, pokud ke stejnému výsledku dospějeme více algoritmy. Používají se buď metody typu „maximum likelihood“ (ML, Felsenstein 1996) nebo „neighbor-joining“ (NJ, Saitou and Nei, 1987). Žádná z metod není „samospasitelná“ a obě generují občas artefakty. Obecně ML je přesnější, ale výpočetně náročnější než NJ, a při velkém objemu dat lze mnohdy reálně použít jen NJ.
- *Statistické zhodnocení.* Spolehlivost zjištěné topologie stromu je nutno ověřit např. tzv. bootstrappingem, a při presentaci výsledků je nutno uvádět alespoň souhrnně výsledky tohoto zhodnocení.

Ani při správně zkonstruovaném dendrogramu se nelze vyvarovat interpretačních nejasností, zejména pokud si nemůžeme být zcela jisti, že jsme identifikovali opravdu všechny příslušníky studované genové rodiny, a že dokážeme spolehlivě vymezit ortologní a paralogní sekvence. Je proto nutno mít vždy na paměti „zlaté pravidlo“, které výstižně formulovala Andrea Hansen (2001, p.40):

„Die Programme ... liefern immer ein Ergebnis. Der Anwender muss selbst entscheiden, ob dieses auch einen Sinn ergibt.“¹

Felsenstein J.: 1996. - Methods in Enzymology 266:418-427

Haas B.J et al.: 2002. - Genome Biology. 3:research0029.1-0029.12

Haas B.J et al.: 2003. - Nucleic Acids Res. 31:5654-5666

Hansen A. 2001.: *Bioinformatik: ein Leitfaden für Naturwissenschaftler.*, Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser.

Saitou N., Nei M.: 1987.: - Mol.Biol.Evol. 4:406-425

Podporováno granty GAČR 204/02/1461 a MŠMT J13/98:113100003.

¹ Programy ... **vždy** dají výsledek. Uživatel sám se musí rozhodnout, zdali výsledek dává smysl.

Identifikace mobilních elementů v genomických sekvencích rostlin pomocí počítačových analýz

Jiří MACAS

Ústav molekulární biologie rostlin, Laboratoř molekulární cytogenetiky, České Budějovice
e-mail: macas@umbr.cas.cz, <http://w3lamc.umbr.cas.cz/lamc/>

Mobilní elementy, jejichž hlavními představiteli jsou DNA transpozóny a retroelementy, tvoří podstatnou část genomů vyšších rostlin. Z důvodu jejich vysoké četnosti a rozptýleného výskytu v genomu jsou často s úspěchem využívány k přípravě molekulárních markerů, založených na inzerčním polymorfismu (přítomnosti nebo absenci) určitého elementu v daném lokusu. Detekce tohoto polymorfismu se obvykle provádí pomocí PCR, a proto se k tomuto účelu hodí zejména velmi krátké elementy, jakými jsou např. SINEs (Short INterspersed Elements) a MITEs (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements). Izolaci lokusů obsahujících tyto elementy lze provádět metodami molekulární biologie, např. screeningem genomických knihoven, který ale naráží na problémy účinné detekce elementů způsobené velkou variabilitou jejich sekvencí. Alternativní metodou je počítačová identifikace inzerce mobilních elementů ve známých sekvencích uložených v databázích DNA, která se vzhledem k rychlému postupu sekvenování genomů mnoha druhů stává stále atraktivnější. Tato metoda navíc umožňuje hledání elementů na základě jejich specifických strukturních rysů, takže je do značné míry nezávislá na variabilitě jejich sekvencí a lze tak identifikovat i dosud neznámé elementy. Tento princip bude v přednášce demonstrován na příkladu hledání MITE elementů v genomických sekvencích hrachu, dostupných v databázi GenBank, a zároveň budou zmíněny některé užitečné nástroje pro počítačovou analýzu sekvencí DNA. Charakteristickými znaky MITEs je jejich ohraničení dvěma obrácenými repeticemi a délka do několika stovek bazí. Za účelem hledání takovýchto sekvencí byl vyvinut počítačový program napsaný v jazyce Perl a využívající modulů implementovaných v rámci projektu BioPerl, které výrazně zjednodušují programování analýz sekvencí DNA a proteinů. Nalezené sekvence potenciálních MITE elementů byly dále analyzovány programy, implementovanými na webovém serveru Biology WorkBench a v programovém balíku Staden package. Homologické sekvence byly vyhledávány programy FastA, BLAST a DBWatcher (ten umožňuje provádět automatické opakované hledání zadané sekvence např. v updatech DNA databází). Výsledkem práce byla identifikace a následná analýza dvou skupin MITE elementů, z nichž jedna patří do dříve popsané nadrodiny typu *Stowaway*, a druhá představuje novou rodinu elementů s několika zajímavými strukturními vlastnostmi, jako jsou extrémně dlouhé koncové repetice a 9 bp duplikace místa inzerce.

Webové odkazy:

BioPerl – <http://www.bioperl.org/> nebo <http://bio.perl.org/>

Biology WorkBench - <http://workbench.sdsc.edu/>

DBWatcher – <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/LocalDoc/DBWatcher/>

GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

Staden package - http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/pubseq/staden_home.html

Metody studia gametofytických transkripčních faktorů v postgenomové éře

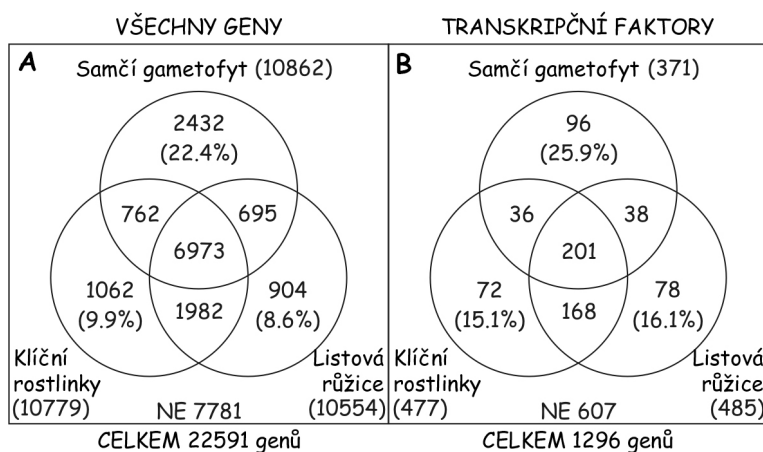
DAVID HONYS¹, DAVID TWELL²

¹ ÚEB AVČR, Rozvojová 135, 16502 Praha 6, ČR; ² University of Leicester, LE1 7RH Leicester, United Kingdom
Tel.: 220390450, e-mail: honys@ueb.cas.cz

Úplné osekvenování genomu *Arabidopsis thaliana* (AGI 2000) a průběžně probíhající anotace kódujících sekvencí (TIGR 2002) způsobily, že jsme se i v rostlinné říši ocitli v postgenomové éře. Tato skutečnost razantně změnila metody studia genové exprese a její regulace. Dalším milníkem bylo zavedení čipové technologie a zejména uvedení na trh 23K genového čipu (Affymetrix) v loňském roce obsahujícího téměř 85% z více než 27 000 známých kódujících sekvencí *Arabidopsis*. Aplikace čipové technologie umožnila v jediném pokusu získat informace o aktuálním stavu exprese naprosté většiny kódujících genů v dané skupině buněk, orgánu či celé rostlině. Stále se rozšiřující počet již charakterizovaných transkriptomů rozličných typů rostlinných pletiv a orgánů za variabilních experimentálních podmínek (www.arabidopsis.info) v rychle rostoucí míře umožňuje studium regulace genové exprese na globální úrovni, funkční analýzu transkripčních faktorů a sítí jimi kontrolovaných genů.

Uvedená globální analýza, ač vypadá poměrně snadno, má v současné době několik úskalí. Prvním z nich je, že charakterizace transkriptomu nám dává statický obrázek o stavu genové exprese v daném vzorku v jeden konkrétní okamžik. Regulace genové exprese v čase je však jevem dynamickým, k jehož studiu potřebujeme poznat změny v expresi zkoumaných genů v několika časových bodech. Dále aktivace či inhibice jednotlivých genů probíhá na buněčné úrovni a kinetika těchto jevů není synchronizována v rámci celých orgánů. Ideálním stavem je tedy v současné době studium transkriptomu jediné vyvíjející se buňky. Toto úskalí souvisí s druhým problémem, kterým jsou naše poněkud neohrabané metody izolace RNA, které neumožňují reprodukovatelnou izolaci homogenní populace mRNA z jednotlivých rostlinných buněk v množství dostatečném pro čipovou analýzu. Právě z uvedených důvodů je velice vhodným modelovým systémem vyvíjející se samčí gametofyt, který je z funkčního hlediska jednobuněčným systémem a u něhož existují postupy izolace homogenních populací buněk v několika cytologicky přesně charakterizovaných vývojových stádiích.

Velikosti a vzájemné průniky gametofytického a dvou sporofytických transkriptomů jsou znázorněny na obrázku A. Genom *Arabidopsis* obsahuje téměř 1600 genů kódujících transkripční faktory (Riechmann et al., 2000), z nichž 371 bylo nalezeno i v samčím gametofytu. Jejich distribuce je na obrázku B. Předmětem přednášky pak budou bioinformatické a molekulárně genetické metody studia těchto gametofytických transkripčních faktorů. Z metod bioinformatických se jedná o analýzu čipových dat, hierarchické třídění koexprimovaných skupin genů, *in silico* identifikaci regulačních cis-sekvencí a identifikaci pravděpodobných vazebných bílkovin. Metody molekulárně biologické zahrnují zejména studium interakcí mezi makromolekulami a metody reverzní genetiky, přístupy „loss-of-function“ a „gain-of-function“.



Vennovy diagramy znázorňující gametofytickou a sporofytickou expresi u *Arabidopsis* na úrovni všech genů (A) a transkripčních faktorů (B) přítomných na 23K genovém čipu. Jednotlivé datové soubory odpovídají transkriptomům samčího gametofytu, klíčících rostlinek a sporofytu ve vegetativním stavu (Listová růžice). Čísla v závorkách udávají celkový počet genů exprimovaných v daném transkriptomu, NE odpovídá neexprimovaným genům a CELKEM udává celkový počet příslušných genů přítomných na 23K genovém čipu.

AGI, The Arabidopsis Genome Initiative: 2000 - Nature. 408: 796-815

Riechmann JL, Heard J, Martin G et al.: 2000 - Science 290: 2105-2110

TIGR, The Institute for Genomic Research: 2002 - Arabidopsis Genome Annotation Release 3.0: ftp://ftp.tigr.org/pub/data/a_thaliana/ath1/

Podporováno grantem NATO/Royal Society Postdoctoral Fellowship.

Regulace transkripce *in silico*

DAVID REŇÁK

¹ ÚEB AVČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6

Tel.: 220 390 452, e-mail: d.renak@seznam.cz

S postupnou sekvenací dalších genomů přibývá nových dat rychleji než jim stačíme rozumět. Jejich funkční analýza se stává náplní přicházející post-genomické éry. V souvislosti s tímto trendem se mění i způsob práce se získanými daty. Jsou to postupy označované jako *in silico*, neboť využívají výpočetní techniky ke zpracování velkého množství informací, které jsou postupně odhalovány ve struktuře genomu a jsou náplní bioinformatiky.

Pracovní nástroje bioinformatiky jsou v překotném rozvoji, neustále se doplňují a rozvíjejí. Tím se také rozšiřuje oblast jejich použití ve zpracování bioinformací. Šíření těchto aplikací podporují dvě skutečnosti: dostupnost základních sekvenčních dat, která neustále narůstají, a dostupnost pracovních nástrojů ke zpracování těchto dat, které jsou volně dostupné na internetu. Předmětem studia bioinformatiky jsou analýzy DNA, RNA i bílkovin. Na úrovni DNA jsou to především práce s genomem – určení jeho velikosti, obsahu G+C párů, vytyčení kódujících a nekódujících oblastí, stanovení hustoty a počtu genů, jejich průměrné velikosti, analýza promotorových oblastí a enhancerů, hledání intronů a exonů, tvorba restrikčních map, navrhování PCR primerů, evoluce genů a genových rodin a vytváření fylogenetických stromů. Na úrovni RNA je to charakterizace transkriptomu, určení transkriptů a míry jejich exprese v průběhu vývinu organismu, zajímavé jsou predikce sekundární struktury RNA a jejich vlastností, hledání malých nekódujících RNA, transferových RNA, evoluce ribosomální RNA. Informace kódující RNA poskytuje primární strukturu bílkovin, analýza jejich aminokyselin umožňuje stanovení fyzikálně-chemických vlastností bílkovin, modelování 3-D struktury, charakterizace jednotlivých domén a oblastí s možnými interakcemi, je možné předpovědět biologické vlastnosti a post-translační modifikace bílkovin.

Je patrné, že možnosti bioinformatiky jsou široké. Jedna z užitečných aplikací je analýza transkriptomu v jednom časovém okamžiku. S výhodou lze použít techniky DNA čipu ke zjištění míry exprese jednotlivých genů v určitém vývojovém stádiu. Z celého souboru je možno vybrat ty transkripty, které vykazují stejnou míru exprese. Existuje předpoklad, že tyto transkripty by mohly být regulovány stejnými transkripčními faktory. V tomto případě jsou *in silico* vyhledávány předpokládané konsensus sekvence regulačních oblastí. Pokud taková sekvence existuje, je vysoký předpoklad, že daná skupina genů je regulována stejnými transkripčními faktory. Takto vyhledané geny mohou být i lokusy pro další transkripční faktory. Vhodným modelem pro tato studia je samčí gametofyt rostlin – mikrospóra, pylové zrno a pylová láčka. Jsou to struktury vznikající zcela specifickým vývojovým programem a právě funkční analýza genů transkripčně regulovaných na počátku vývoje mikrospóry může významně přispět k porozumění počátečních procesů, které nakonec vedou k vývoji zcela specifické buňky.

Bioinformatika poskytuje řadu nástrojů k řešení mnoha otázek molekulární biologie, a to nástrojů tak efektivních a rychlých, že i bez větší práce lze získat mnoho informací zásadního charakteru. Je třeba však připomenout, že žádná hypotéza vypracovaná *in silico* se neobejde bez ověření řádným pokusem na úrovni *in vivo* nebo *in vitro*.

TILLING: reverzní genetikou k porozumění funkce genů

JOSEF FIŠER

GeneTiCA s.r.o. Služeb 4, Praha 10, 108 52

Tel.: 272 701 055

Narůstající znalosti o sekvencích genů posouvají současnou genomiku výraznou měrou ke snahám zajímat se nejenom o strukturu ale zejména o funkci genů. Jednou z možností je využití postupů reverzní genetiky, tedy identifikace funkce genů o známé sekvenci fenotypovou analýzou buněk či organismů, u kterých funkci těchto genů vyřadíme. Užívané strategie jako je použití transpozonů, „gene silencing“ či využití RNA interference doplňuje nyní další metodika- TILLING (Targeted Induced Local Lesions IN Genomes), která nachází uplatnění především v oblasti výzkumu rostlin. Semena jsou vystavena působení chemického mutagenu např. EMS (ethylmethansulfonát). Populace rostlin vzniklá z těchto semen obsahuje náhodné bodové mutace. Selektivním poolováním DNA a amplifikací pomocí fluorescenčně značených primerů vznikají heteroduplexy mezi přirozenou a mutantní DNA. Heteroduplexy jsou inkubovány s endonukleázou *CEL I*, která štěpí „mismatch“ místa. Výsledné produkty jsou vizualizovány na sekvenačním gelu a následná analýza individuální rostlinné DNA z poolované DNA identifikuje rostlinu nesoucí mutaci.

Oproti ostatním metodám využívaným v reverzní genetice má TILLING několik důležitých výhod. Především umožňuje provádět identifikaci mutací u cílových genů bez použití GMO.

Ve srovnání s metodami, které používají „knockout“ genů je možné hodnotit i efekty pouze částečného vyřazení genu. Významnou výhodou je možnost snadné automatizace do „high- throughput“ vyšetřování.

Modely vývojové biologie rostlin

BORIS VYSKOT

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Královopolská 135, 612 65 Brno
Tel./fax: 541 240 500, e-mail: vyskot@ibp.cz, www.ibp.cz/labs/

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 253

***Arabidopsis thaliana* jako nástroj identifikace funkce rostlinných genů**

BŘETISLAV BRZOBOHATÝ^{1,2}

¹ Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, ČR

² Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR
Tel.: 541517184, e-mail: brzoboha@ibp.cz

Zvolení vhodného modelového organismu je jedním z klíčových předpokladů pro systematický pokrok v kterékoliv oblasti biologického výzkumu. Nalezení konsensu v oblasti volby modelové rostliny si vyžádalo dlouhý čas. Rostoucí vliv molekulární biologie sehrál rozhodující roli ve sjednocení rostlinné komunity na volbě malé plevelné rostlinky huseníčku (*Arabidopsis thaliana*). Molekulární biologie totiž nabídla perspektivu rychlého zúročení výhod plynoucích z malé velikosti genomu, hluboce rozpracované genetiky, snadnosti genetické transformace prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, krátké generační doby, vysokých výnosů semen a možnosti kultivace velkých souborů jedinců na relativně malých plochách. Tyto přednosti převážily nad nepřehlédnutelnými komplikacemi, které plynou z drobného vzrůstu huseníčku, při biochemických a buněčně-biologických experimentech vyžadujících např. izolaci proteinů, membrán nebo organel.

Stanovení sekvence genomu v roce 2000 otevřelo perspektivu využití *Arabidopsis thaliana* jako nástroje identifikace funkce celého základního souboru 25 000 rostlinných genů. Vzhledem k současným a v brzké době očekávaným metodickým pokrokům je předpokládáno dosažení tohoto cíle do konce roku 2010.

Dostupnost kompletní sekvence genomu *Arabidopsis thaliana* silně urychluje identifikaci genů na základě fenotypových projevů mutací nově identifikovaných i dříve nalezených a charakterizovaných klasickými genetickými přístupy. Reverzní přístup vychází z možnosti generovat sbírky linií, u nichž bylo dosaženo vysokého stupně saturace genomu inzercemi vhodných genetických elementů. Molekulárně genetickými přístupy je pak možné nalézt inzerci v genu zájmu a následně dedukovat jeho funkci z analýzy fenotypových projevů absence příslušného genového produktu. V řadě případů se ukazuje cennou možností navození podmíněných mutací. K jejich získání je možné využít redukce exprese zkoumaného genu přístupy antisense-RNA nebo kosuprese/RNAi v uspořádání, kdy je pro expresi odpovídajícího konstruktů zvolen vhodný systém regulovatelné exprese transgenů. K objasnění funkce genů rovněž významnou měrou přispěla analýza fenotypových projevů jejich ektopické exprese s využitím konstitutivních a v poslední době především regulovatelných systémů genové exprese. Správně cílené využití nástrojů reverzní genetiky vyžaduje podrobnou znalost expresních profilů genomu v jednotlivých vývojových stádiích a za různých podmínek vnějšího prostředí. Informace o kompletní sekvenci genomu *Arabidopsis thaliana* je základem pro přípravu DNA chipů umožňujících jejich získání. Jsou vyvíjeny systémy, které umožní přejít od analýzy těchto profilů ve vzorcích připravených z celistvých rostlin nebo orgánů k analýzám na úrovni jednotlivých buněčných typů. S využitím zejména dvourozměrné elektroforézy a technik hmotnostní spektrometrie jsou získávány první poznatky o dynamice proteomu v průběhu vybraných vývojových procesů a odpovědí na změny vnějšího prostředí. Získané informace jsou integrovány v komplexních databázích (www.arabidopsis.org).

Podporováno granty LN00A081, MSM143100008 a KSK5052113.

Inzerční mutagenese ve funkční genomice *Arabidopsis thaliana*

JAN HEJÁTKO^{1,2}, MARKÉTA PERNISOVÁ², ROMANA DOBEŠOVÁ², JAKUB HORÁK^{1,2} A BŘETISLAV BRZBOHATÝ^{1,2}

¹ Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65, Brno, ČR

² Laboratoř funkční genetiky a proteomiky, PřF Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37, Brno, ČR

Tel.: 541 129 368, e-mail: hejatro@sci.muni.cz

Přístupy používané při identifikaci funkce jednotlivých genů u rostlin prošly v posledním desetiletí zásadní kvalitativní proměnou. Na rozdíl od přístupů klasické genetiky, kde gen je definován jako (více či méně) abstraktní faktor určující biologické vlastnosti organismu za daných podmínek, znalost struktury genomu a molekulárně genetické přístupy změnily naše chápání genu jakožto jednotky daných fyzikálních vlastností (tedy především specifické sekvence nukleotidů). V dnešním pojetí funkční genetiky lze gen zkoumat nezávisle na fenotypových projevech, které jsou výsledkem jeho biologické funkce a umožňuje tak identifikaci a studium funkce genů, které by přístupy klasické genetiky byly jen velmi těžko, případně vůbec ne, detekovatelné.

Inzerční mutagenese se stala jedním z prvních přístupů umožňujícím spojení molekulárního chápání genu s jeho (mnohdy předpokladatelnou) funkcí. Analýza fenotypových projevů inzerčních mutantů se změněnou mírou exprese daného genu zpravidla vede ke konečné identifikaci role genu ve vývoji organismu. Příkladem výše zmíněného přístupu je identifikace role genu pro receptorovou histidinkinázu *CKII* ve vývoji *Arabidopsis thaliana*. Inzerční mutagenese zde byla použita jak pro ekotopickou nadprodukcii proteinu kódovaného genem *CKII*, tak pro přípravu inzerčních mutantů s inhibovanou expresí tohoto genu. Fenotypové projevy obou mutantů (diferenciace kalusů v nepřítomnosti rostlinných hormonů resp. defekty v megagametogenezi) vedly k identifikaci role genu *CKII* ve vývoji *Arabidopsis* (Hejátko *et al.* 2003), nikoliv však k jednoznačné identifikaci funkce genového produktu na buněčné úrovni. Dalším příkladem studia genu, který by přístupy klasické genetiky pravděpodobně nikdy nebyl identifikován, je gen *ARR21*, předpokládaný přenašeč signálu v dvoukomponentovém signálním systému u rostlin. Tento gen byl rozpoznán jako homolog již dříve popsáných genů u bakterií a kvasinek. Přesto, že byla v důsledku inzerce neautonomního transpozonu potvrzena změna exprese genu *ARR21* na úrovni RNA, nebyly u identifikovaného inzerčního mutantu zjištěny žádné fenotypové odchylky od standardního typu, pravděpodobně důsledkem funkční redundance v rámci genové rodiny (Horák *et al.*, 2003).

Při inzerční mutagenesi jsou nejčastěji používanými mutageny autonomní nebo neautonomní rostlinné mobilní elementy (transpozony) a T-DNA. Výhodou použití mobilních elementů je možnost vytváření stabilních mutantních alel vzniklých po chybné excizi elementu, vedoucích jak *i*) k inhibici syntézy genového produktu tak *ii*) k obnovení čtecího rámce a reverzi ke standardnímu typu. Výhodou použití T-DNA je možnost vytvářet mutantní linie s lépe definovaným genetickým pozadím, často však může docházet i k rozsáhlým chromozomálním aberacím, znesnadňujícím identifikaci role mutovaného lokusu. Výhody i nevýhody obou těchto přístupů budou demonstrovány *i*) na příkladu identifikace stabilních alel genu *CKII* (*ckil-s1(2)*, respektive *ckil-r*) v případě mutagenese pomocí kukuřičného transpozonu *En-1* a *ii*) na identifikaci rozsáhlé inverze na chromozomu 2 mezi lokusy *NAD7* a *ORE9* v případě T-DNA mutagenese.

Znalost úplné sekvence genomu *Arabidopsis* spolu s vytvořením elektronických databází inzerčních mutantů vedly ke zjednodušení identifikace mutantních linií a ke zpřístupnění této metody prakticky pro každou laboratoř. Servis poskytovaný NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, <http://nasc.nott.ac.uk/>) umožňuje centralizované prohledávání několika databází inzerčních mutantů pomocí programu BLAST s přímou vazbou na možnost objednání semen vyhledaných mutantních linií. Naše zkušenosti s touto službou budou prezentovány na příkladu identifikace inzerčních mutantů v genu *CRE1*.

Hejátko J., Pernisová M., Eneva T., Palme K. and Brzobohatý B.: 2003- Mol.Gen.Genomics 269: 443- 453

Horák J., Brzobohatý B. and Lexa M.:2003-Plant Biol. 5: 245-254

Podporováno granty LN00A081, MSM143100008 a Z5004920.

Model studia generativního vývoje vyšších rostlin

VĚRA ČAPKOVÁ

ÚEB AVČR, Rozvojová 135, Praha 6 - Dejvice, ČR

Tel.: 220390452, e-mail: capkova@ueb.cas.cz



Honyš D.: Diplomová práce 1995

Modelem studia generativního vývoje vyšších rostlin je samčí gametofyt, jeho diferenciace od postmeiotické mikrospory přes zrání pylové zrna až po pylovou láčku, transportní zařízení pro přenos spermatických buněk do zárodečného vaku. Je to systém časově i morfologicky přesně determinované diferenciace. I když se jedná nejprve o jednobuněčný, posléze dvou- a nakonec trojbuněčný orgán, diferenciace gametofytu je na úrovni genové exprese regulována jedinou a to vegetativní buňkou, která se přetváří až v makroskopickou pylovou láčku. Vysoká míra synchronizace diferenciačního procesu dobře korelující s velikostí poutat a možnost sledování diferenciace za in vitro podmínek jen potvrzují výhody tohoto modelu. K jakému typu studia je tento model vhodný:

- 1) Jak již bylo zmíněno, je to přirozený model umožňující i u rostlin studovat diferenciaci jediné buňky. Pokud zvolíme ke studiu *Arabidopsis thaliana*, je možno plně využít znalost genomu k transkriptomice, ke sledování postupné exprese pylově specifických genů. Pokud zvolíme *Nicotiana tabacum*, kde růst pylové láčky je podmíněn intenzivní transkripcí mRNA molekul syntetizovaných a v netraslatovatelné podobě skladovaných již během zrání pylových zrn, máme k dispozici model translační regulace genové exprese. Můžeme analyzovat kompartmentaci neaktivních transkriptů a identifikovat mRNA-vazebné proteiny podílející se na inaktivaci a následně na aktivaci pylově specifických transkriptů.
- 2) Možnost indukce pylové embryogeneze, přeměny vyvíjejícího se pylového zrna v haploidní embryo je nejen stále využívaným modelem získávání haploidních rostlin pro šlechtitelské účely, ale je také modelem studia odpovědi buňky na zásadní změnu programu, na záměnu probíhající gametogeze ve sporofytickou haploidní embryogenezi.
- 3) Asymetrická mitosa mikrospory je modelem využívaným ke studiu podmínek a důsledků tohoto neobvyklého jevu.
- 4) Metabolická závislost gametofytu na okolním somatickém pletivu nabízí hned několik možností studia. Časově a metabolicky determinovaná interakce gametofytu s tapetem a posléze s vodicími pletivy pestíku se nabízí jako model studia přenosu signálů či vlastních interakcí na úrovni pronikání makromolekul mezi oběma typy pletiv a v neposlední řadě podílu gametofytu na indukci apoptozy jak tapeta, tak blizny a čnělky. Dlouhodobě studovaná inkompatibilita se v současnosti stala jedinečným modelem geneticky podmíněné selektivní interakce obou typů pletiv.

Pyl, nejčastěji používané označení pro samčí gametofyt, není jen nepříjemným alergenem nebo mnohostranně využitelným modelem ale zůstává především fascinujícím systémem nacházejícím zcela bezchybně právě jen odpovídající bliznu a to bez ohledu na bohaté zastoupení pylů mnoha dalších rostlinných druhů.

Buněčné kultury vyšších rostlin

JAN PETRÁŠEK^{1,2}, EVA ZAŽÍMALOVÁ^{1,2}, ZDENĚK OPATRNÝ¹

¹ Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR

² Ústav experimentální botaniky AVČR, Rozvojová 2/135, 16502 Praha 6, ČR

Tel.: 220390425, e-mail: petrasek@ueb.cas.cz

Buněčné kultury vyšších rostlin představují v současné době experimentální materiál, který vhodně doplňuje výzkum celistvých rostlin či jejich částí. V zásadě je možné buněčné kultury dělit na dvě základní skupiny. Jedná se o kultury buněk somatických, pocházejících z nejrůznějších pletiv rostlinného těla, a kultury pocházející z mikrospor. Zatímco první skupina kultur může sloužit jako modelový materiál při studiu vegetativního vývoje rostlin, druhá může představovat model vývoje generativního.

Přednáška bude zaměřena na buněčné kultury somatických buněk pěstovaných v tekutých médiích (tzv. buněčné suspenze), možnosti jejich ustavení, kultivace a dalšího vývoje. Mezi hlavní požadavky na kvalitní buněčnou suspenzi patří především její vysoká rozpadavost, co nejvyšší dělivá schopnost, vyrovnanost buněčného fenotypu a hlavně stabilita během dlouhodobější kultivace. Takovýmto nárokům mnoho buněčných kultur nevyhovuje. Vzhledem ke svým vlastnostem je dnes jednoznačně nejpoužívanější buněčnou linií buněčná linie tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 (Nagata 1992; Nagata et al 2004). Tato buněčná linie poskytl a poskytuje cenné poznatky zejména při studiu buněčného cyklu, cytoskeletálních struktur, intracelulárního transportu proteinů, fytohormonálních regulací a sekundárního metabolismu. Možnosti genomiky a proteomiky jsou vzhledem ke značné velikosti a složitosti amfidiploidního genomu u buněčné kultury BY-2 poněkud omezeny. Ve srovnání s buněčnými kulturami dosud získanými z modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* však představuje buněčná linie tabáku BY-2, ale i některé další buněčné linie, jednoznačně homogennější a stabilnější experimentální systém. Navíc, relativně snadný přenos nejrůznějších genových konstruktů do buněk linie BY-2, sledování projevů jejich exprese, analýza transkripčních profilů v průběhu buněčného cyklu (<http://mrg.psc.riken.go.jp/strc/index.htm>; Breyne et al. 2002) a analýza proteomu (Laukens et al. 2003) poskytují v kombinaci s unikátní homogenitou a vysokou dělivou schopností buněčné populace BY-2 kvalitativně nové experimentální možnosti.

Breyne P., Dreesen R., Vandepoele K., De Veylder L., Van Breusegem F., Callewaert L., Rombauts S., Raes J., Cannoot B., Engler G., Inze D., Zabeau M.: 2002 - PNAS 99 (23): 14825-14830

Laukens K., Deckers P., Esmans E., Van Onckelen H., Witters E.: 2003 - DOI: 10.1002/pmic.200300614

Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S.: 1992 - Int Rev Cytol 132: 1–30

Nagata T., Hasezawa S., Inzé D.: 2004 – Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 53

Podporováno MŠMT, projekty č. LN00A081 a ME585.

Postgenomické přístupy ke studiu genové exprese - technologie DNA microarray - možnosti a využití

PETER ŠEBO

Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů, MBÚ AV ČR Praha

V přednášce představím základní principy technologie *DNA microarrays* pro celogenomové studie expresních profilů (např. *spotted arrays* versus systém Affymetrix), proberu jejich specifické klady a zápory a představím vybavení pro tisk a analýzu klasických *DNA microarrays*, které je k dispozici v naší laboratoři v MBÚ AV ČR. Dále pojednám o finančních a technických nárocích těchto technologií a jejich využití pro identifikaci SNP. Přednášku uzavřu představením konkrétních experimentů a výsledků, které jsme získali při studiu exprese genů invazivního meningokoka *Neisseria meningitidis* na úrovni transkriptomu (*DNA microarrays*) a proteomu (2-DE).

Identifikace a izolace cDNA funkčně homologních genů

JAROSLAV FULNEČEK

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel.: 541 517 230, e-mail: fulnecek@ibp.cz

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 171

Použití SMART technologie přípravy cDNA při práci s rostlinným materiálem

HELENA ŠTORCHOVÁ

ÚEB AVČR, Rozvojova 135, 16500 Praha 6, ČR

Tel.: 220 390 433, e-mail: storchova@ueb.cas.cz

Firma Clontech nabízí sadu kitů SMART určených k přípravě cDNA a knihoven. Postup SMART, který je patentován, vychází z celkové RNA anebo polyA+RNA v množství již od několika ng. První řetězec je syntetizován speciální reverzní transkriptázou, která po úplném zkopírování RNA přidá ke 3' konci několik C, a poté pokračuje syntézou DNA (switch template). Dvouřetězcová cDNA je připravena pomocí PCR se specifickými primery. Během této PCR jsou amplifikovány pouze úplné kopie výchozí RNA molekuly. Fragmenty cDNA vzniklé po předčasném odpojení reverzní transkriptázy od templátu nejsou pomnoženy. Reprezentativnost cDNA, tj. míra, ve které odpovídá její složení abundanci jednotlivých tříd mRNA ve výchozím vzorku, je dána počtem cyklů PCR.

SMART postup je využit v proceduře subtraktivní hybridizace, schopné nalézt rozdílně exprimované geny u vzorku RNA z jednotlivých buněk. SMART kity byly původně vyvinuty pro práci se savčími tkáněmi. Lze je však velmi dobře použít i u rostlinného materiálu. V tomto případě je však nutno firemní protokoly modifikovat. Původní protokol jsem upravila za účelem přípravy cDNA knihovny z poupat *Silene vulgaris*. První stovka sekvenovaných klonů ukázala vysokou reprezentativnost knihovny, stejně tak i překvapivou délku cDNA inzertu. Deset ze sta nahodně vybraných cDNA klonů bylo delších než 6 kb.

Využití metod slot-blot hybridizace pro screening sekvencí v rostlinných genomech

EVA SÝKOROVÁ^{1,2}, Jiří FAJKUS¹, KAMILA NEPLECHOVÁ¹

¹ Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, Masarykova univerzita v Brně a Laboratoř molekulárních komplexů DNA, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno

² Queen Mary, University of London, E1 4NS, London, UK

Techniky, jakými jsou Southern, Northern nebo Western hybridizace, jsou dnes v laboratořích široce využívány. Chceme-li určit počet kopií nějaké sekvence v genomové DNA nebo přítomnost transkriptů některého genu v RNA, sáhneme patrně v první řadě po hybridizačních technikách. Tyto metody však mohou najít uplatnění jako výborná doplňková a také poměrně nenáročná screenovací technika, máme-li před sebou úkol zjistit zda a v jakém množství je nějaká sekvence přítomna v genomech druhů navzájem blíže nebo i vzdáleněji příbuzných, vyhledat pak vhodný objekt dalšího zájmu, či dokonce vyvodit nějaké závěry z hlediska evoluce zkoumané sekvence.

Obecně metoda slot-blot (česky také čárka-blot) hybridizace spočívá v přenosu vzorku chemicky denaturované DNA (obvykle v 0,4 M NaOH) na nylonovou membránu (nejlépe pozitivně nabitou, např. HybondN+, resp. Hybond XL, Amersham Biosciences), čímž získáme membránu pro hybridizaci se značenou sondou. Výrobci membrán často poskytují vlastní protokoly. Přenos DNA na membránu je nejlépe provádět na speciálním aparátu s komůrkami, v němž je membrána podložena několika vrstvami filtračního papíru, který zajistí důležitou těsnost aparatury (DNA je prosávána komůrkami s použitím laboratorní vývěvy). Po promytí komůrek 0,4M NaOH a 2xSSC je membrána připravena pro hybridizaci. Značení a výběr sondy, stejně jako podmínky hybridizace jsou velmi závislé na konkrétní aplikaci. Z hlediska dosažitelné citlivosti je samozřejmě nejlepší radioaktivní značení, a to buď koncové značení polynukleotid kinázou, je-li jako sonda použit oligonukleotid, nebo značení inkorporací značeného deoxynukleotidu, jde-li o sondu na bázi fragmentů dvojvláknové DNA (dále jen dsDNA). Inkorporace může být provedena mnoha různými technikami – od přípravy značeného PCR produktu, přes prodloužení z náhodných dekanukleotidů DNA Polymerázou I- Klenow fragment, až po nick-translaci, používanou spíše pro značení celkové genomové DNA a křížový screening např. genomových knihoven (Sambrook *et al.*, 1989). Standardní podmínky hybridizace používané v naší laboratoři jsou – 1 hod prehybridizace v hybridizačním pufru (0,5 M fosfát sodný, pH 7,5; 7% SDS), po přidání tepelně denaturované naznačené sondy hybridizace přes noc (cca 16 hodin) a odmývání roztokem 2xSSC, 0,1xSDS pro oligonukleotidové sondy nebo roztokem 0,2xSSC, 0,1xSDS pro dsDNA fragmenty použité jako sondy (Sambrook *et al.*, 1989). Teplota hybridizace je dodržena i v odmývacím kroku a obvykle používáme 55°C pro oligonukleotidy a 65°C pro sondy dsDNA. Tyto podmínky jsou pouze jednou z výchozích možností a v závislosti např. na T_m použitého oligonukleotidu nebo obsahu A/T ve fragmentu DNA, použitém jako sondy, mohou být nastaveny pro konkrétní případ. Po expozici na RTG filmu nebo na dnes již v mnoha laboratořích dostupném phosphoimageru (např. STORM a TYPHOON, Amersham Biosciences, nebo BAS a FLA, FUJI) můžeme v závislosti na síle signálu provést vyhodnocení jak kvalitativní tak i kvantitativní.

Jako příklad využití těchto postupů k řešení konkrétního problému nám mohou posloužit rostliny řádu Asparagales a jejich telomerické sekvence. Konce chromosomů eukaryontních organismů jsou chráněny specializovanými nukleoproteinovými strukturami – telomery. Jejich DNA složka je tvořena krátkými repetitivními sekvencemi minisatelitního typu (délka jednotky 5-25bp) typickými pro určitou skupinu organismů, jako např. TTAGG u hmyzu, TTAGGG u obratlovců, TTTAGGG u rostlin. Přestože tyto repetice jsou si sekvencně velice blízké, už proteiny vázající se na telomerovou DNA mohou být ve své vazbě velmi specifické. U rostlin byl do roku 2000 znám jediný případ, kdy chromosomy nebyly opatřeny telomerou s klasickou sekvencí TTTAGGG - příslušníci rodu *Allium*, kam patří cibule, česnek a jiné (Fuchs *et al.*, 1995). Později (Adams *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2000) byly identifikovány další skupiny rostlin bez typických telomer, a to technikami slot-blot hybridizace, FISH a asymetrické PCR. Porovnáním s taxonomickými daty pak byl identifikován bod v evoluci těchto jednoděložných rostlin, kdy pravděpodobně došlo ke ztrátě typických telomer u Asparagales. Žádný organismus však nemůže přežít bez zabezpečení integrity genomu ochranou svých chromosomů, kterou zprostředkovávají právě telomery (Muller, 1938, McClintock, 1941).

Telomery jsou udržovány specializovaným enzymem „telomerázou“, která telomery prodlužuje pomocí reversní transkripce templátové domény své RNA podjednotky se sekvencí odpovídající telomerické repetici. U člověka je dnes podrobně popsán také rekombinační mechanismus udržování telomer nezávislý na telomeráze (Bryan *et al.*, 1997), který se uplatňuje jako alternativa u rakovinných buněk a víme, že i jiné organismy (např. kvasinky) jsou jej schopny v extrémních podmínkách spustit (McEachern, 2002; McEachern and Blackburn, 1996; Teng and Zakian, 1999). Rostliny skupiny Asparagales tedy buď musely vyvinout nějaký alternativní mechanismus udržující jejich telomery a/nebo došlo ke změně v sekvenci telomerické repetice, zřejmě v důsledku mutace telomerázy. Metoda slot-blot hybridizace s použitím oligonukleotidových sond odpovídajících sedmi různým typickým telomerickým repeticím umožnila screening celé skupiny

Asparagales (Sýkorová *et al.*, 2003) a vedla k závěru, že typickou telomerickou sekvencí je v jejich případě TTAGGG, obvyklý u obratlovců včetně člověka. Překvapivě sekvenčně velice si blízké telomerické repetice různých skupin organismů, liší se často v jednom nukleotidu a představují tak pouze bodové nesrovnalosti pro hybridizaci, poskytovaly velmi specifický signál a nízkou (někdy nulovou) úroveň cross-hybridizace.

Tento konkrétní případ může ilustrovat obtíže, se kterými se můžeme setkat v praxi. Především je nutno si uvědomit, že slot-blot hybridizace nám poskytuje pouze **údaj o přítomnosti sekvenční v genomu**, nedává však žádnou informaci o **lokalizaci v genomu**. V případě Asparagales bylo nutno ověřit terminální pozici pomocí FISH a dalšími technikami. Záludnou může být i **síla signálu** a z ní vyhodnocovaný počet kopií, nebo lépe zastoupení sekvenční v genomu. Protože se zpravidla na membránu nanáší 1 µg nebo jiné zvolené konstantní hmotnostní množství genomové DNA, další vyhodnocení silně závisí na **velikosti genomu** (a zda je známa, což není splněno v mnoha případech). Je snadné si představit, jaký rozdíl v zastoupení bude mít sekvenční poskytující stejně silný signál v genomu *Nicotiana sylvestris* (1C=2,8pg) a v genomu *Cyphomandra sibundoyensis* (1C=15,3pg, obojí Solanaceae). Dalším úskalím může být porovnávání signálů z různých membrán. V případě Asparagales jsme celkově vyhodnocovali 116 vzorků genomových DNA, které se pochopitelně nedaly umístit všechny na jednu membránu. Neměli bychom proto zapomínat na kontrolní vzorky stejné na všech srovnávaných membránách a podle nich normalizovat sílu signálu. V našem případě to byly genomové DNA z organismů s různými typy telomer – *Nicotiana sylvestris* (rostliny), *Homo sapiens* (vertebrata), *Bombyx mori* (hmyz), *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlamydomonas, TTTTAGGG). Samostatnou kapitolou je problematika tzv. **cross-hybridizací**, kdy dostaneme falešně pozitivní signál i u vzorku, který prokazatelně hledanou sekvenci neobsahuje. Z velké části se cross-hybridizace můžeme vyvarovat správným nastavením podmínek hybridizace i následného odmytí, protože jde zčásti o technickou záležitost. Posledním závažným problémem, se kterým se můžeme setkat je **rehybridizace** již jednou hybridizované, od předchozí sondy odmyté membrány, jinou sondou. Může se stát, že při odstraňování předchozí sondy přijdeme i o část genomové DNA z membrány, což je zvláště nepříjemné, pokud chceme porovnávat sílu signálu z různých sond vypovídající o kvantitativních rozdílech v jejich zastoupení ve stejném genomu. Proto je dobrým a spolehlivým pravidlem používat pro každou sondu novou membránu, je-li to možné. Pokud už musíme membránu hybridizovat znovu, systém kontrolních vzorků a srovnání hybridizačních signálů z jiné (nové) membrány se stejnými kontrolami na rehybridizované membráně nám může velice pomoci s vyhodnocováním.

Materiálové nároky: běžné laboratorní chemikálie, vodní vývěva nebo jiná vývěva s redukovatelným výkonem, aparatura pro slot-bloty (např. od BioRad), nylonová membrána, reagentie pro radioaktivní značení – alfa[³²P]dATP(dCTP) nebo gama[³²P]ATP, polynukleotid kináza nebo Klenow-polymeráza, případně komerční kit pro značení (např. DecaPrime Labeling Kit, MBI Fermentas).

Literatura:

- Adams, S.P., Hartman, T.P., Lim, K.Y., Chase, M.W., Bennett, M.D., Leitch, I.J. and Leitch, A.R. 2001. - *Proc. R. Soc. Lond. B.* **268**: 1541.
- Adams, S.P., Leitch, I.J., Bennett, M.D. and Leitch, A.R. 2000. - *Chromosoma* **109**: 201.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A. and Reddel, R.R. 1997. *Nat. Med.* **3**: 1271.
- Fuchs, J., Brandes, A. and Schubert, I. 1995. *Pl. Syst. Evol.* **196**: 227.
- McClintock, B. (1941). *Genetics* **26**: 234.
- McEachern, M.J. 2002. Recombinational Telomere Elongation in the Yeast *Kluyveromyces lactis*. In Krupp, G. and Parwaresch, R. (eds.), *Telomerases, Telomeres and Cancer*. Landes Bioscience and Kluwer Academic, Georgetown and New York, pp. 347-358.
- McEachern, M.J. and Blackburn, E.H. 1996. *Genes Dev* **10**: 1822.
- Muller, H. 1938. *The Collecting Net* **13**.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual* (second edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sýkorová, E., Lim, K.Y., Kunická, Z., Chase, M.W., Bennett, M.D., Fajkus, J. and Leitch, A.R. 2003. - *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **270**: 1893.
- Teng, S.C. and Zakian, V.A. 1999. *Mol Cell Biol* **19**: 8083.

Studium transgenní RNA

MILOSLAVA FOJTOVÁ

Laboratoř molekulární epigenetiky, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65, Brno
(tel.: 541 517 230, fax: 541 211 293, e-mail: fojtova@ibp.cz)

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 166

Konstrukce chromozómově specifických BAC knihoven u rostlin

JAROSLAV JANDA, JAN ŠAFÁŘ, JAN BARTOŠ, MARIE KUBALÁKOVÁ, PAVLÍNA KOVÁŘOVÁ, MIROSLAV VALÁRIK, JARMILA ČÍHALÍKOVÁ, HANA ŠIMKOVÁ, JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 77200 Olomouc
Tel.: 585 228 521, e-mail: dolezel@ueb.cas.cz

Pro analýzu struktury jaderného genomu a izolaci genů u rostlin se stále častěji používají knihovny DNA velkých inzertů klonované ve vektoru BAC („bacterial artificial chromosome“). Zatímco u druhů s malými genomy (*Arabidopsis*, rýže) jsou knihovny představovány 10^4 - 10^5 klonů, BAC knihovny mnoha kulturních plodin s velkými genomy mají 10^5 – 10^6 klonů. Práce s tak rozsáhlými knihovnami je komplikovaná a nákladná. Již dříve jsme ukázali, že průtoková cytometrie umožňuje třídít jednotlivé chromozómy rostlin. Tříděné chromozómy byly použity pro cílenou izolaci molekulárních markerů, fyzické mapování a konstrukci chromozómově specifických knihoven DNA malých inzertů. Tyto knihovny jsou ale vhodné jen pro určité aplikace. V průběhu této práce byla vypracována metoda přípravy BAC knihoven z tříděných chromozómů rostlin, která byla úspěšně ověřena u pšenice (*Triticum aestivum*, $2n = 6x = 42$). Byla připravena subgenomová knihovna z chromozómů 1D, 4D a 6D, která představuje 4 ekvivalenty délky těchto chromozómů. Knihovnu tvoří 85 tisíc klonů o průměrné velikosti 85 kbp. Dále byla připravena knihovna specifická pro chromozóm 3B. K zajištění dostatečné reprezentativnosti této knihovny (6ti násobek komplexity chromozómu 3B) bylo zapotřebí cca 65 tisíc klonů o průměrné velikosti inzertů 100 kbp. Jako dosud poslední byla připravena knihovna specifická pro krátké rameno chromozómu 1B (1BS), která obsahuje 60 tisíc klonů a při průměrné délce inzertu 82 kbp představuje 17ti násobné pokrytí jeho délky. Získané výsledky a materiály potvrdily reálnost konstrukce subgenomických BAC knihoven, jejichž využití podstatně zjednoduší a zefektivní mapování a izolaci genů kulturních plodin.

Podporováno Národní agenturou pro zemědělský výzkum (QC1336) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (ME 527 a ME 528).

Od mikrodisekce k mapování struktury genomu

ROMAN HOBZA

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 203, e-mail: hobza@ibp.cz)

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 179

Genetické mapování jako nástroj ke studiu evoluce pohlavních chromosomů rodu *Silene*

VLADIMÍRA HYKELOVÁ

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř vývojové genetiky rostlin, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 203, e-mail: vladka.hykelova@angelfire)

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 183

Forenzní botanika

JARMILA TOMANCOVÁ

Kriminalistický ústav Praha PČR, pošt. schránka 62/KÚP, 170 89 Praha 7, ČR

Tel.: 974 824 501, e-mail: jarmilatomancova@hotmail.com

Znalosti botaniky jsou ve forenzní praxi využívány za účelem identifikace rostlinného materiálu souvisejícího s trestnou činností. Metodiky botanického vyšetření rostlinného materiálu se vztahují nejčastěji k botanickému vyšetření rostlinných drog, fragmentů rostlinného původu a druhu dřeva. Cílem expertízy je taxonomické určení botanického druhu nebo jiné taxonomické kategorie, morfologický popis materiálu, anatomické vyšetření, vyhodnocení materiálu z hlediska lokality nálezů a uvedení souvisejících literárních a legislativních údajů.

Při botanickém vyšetření rostlinného materiálu se využívají metody makroskopické a mikroskopické. Ke správnému výsledku analýzy lze většinou dojít pouze jejich vhodnou kombinací, jediná metoda postačí jen výjimečně.

Za účelem taxonomického zařazení se snažíme vyhledat generativní orgány nebo jejich fragmenty, které poskytují nejvíce identifikačních znaků. V případě, že je nelze nalézt, pokusíme se rekonstruovat tvar listových čepelí, typ stonků atd. U suchého rostlinného materiálu využíváme povaření v destilované vodě za účelem změknutí pletiv a jejich vyrovnaní do původního stavu. Další vyšetření znaků zkoumaného materiálu umožňují mikroskopické preparáty příčných nebo podélných řezů zhotovených na zmrazovacím mikrotomu nebo plošné preparáty práškového materiálu. Na závěr vyhodnocujeme morfologické a anatomické znaky a porovnáváme je se standardy. Srovnávací materiály jsou nejčastěji vysušené nebo ve formě mikroskopických preparátů.

V souvislosti s porušováním zákona o návykových látkách č. 167/1998 Sb. navazuje na botanickou expertízu rostlinných drog ještě kvalitativní a kvantitativní stanovení účinných látek (chemická expertíza).

Mykotická poškození trichologického materiálu

HANA ELIÁŠOVÁ

Kriminalistický ústav Praha PČR, pošt. schr. 62/KÚP, 17089 Praha 7

Tel.: 974 824 500, e-mail: hanaeliasova@atlas.cz

Trichologický materiál je jedním z důležitých objektů zkoumání zajištěných na místě trestného činu nebo v souvislosti s nálezy neznámých mrtvol. Forenzní expertiza spočívá v determinaci původu materiálu, popisu morfoskopických a metrických znaků a v následné komparaci se vzorky vlasů relevantní osoby. Mezi nejvýznamnější patří takové znaky, které se vyskytují v nízké frekvenci a mají tak vysokou identifikační hodnotu nebo nám vypovídají o relevantnosti stopy.

Mykotické afekce vyvolané *ante mortem*, před separací vlasů, resp. chlupů, jsou zcela sporadicky zaznamenávána v naší současné populaci. Jsou proto jedním z význačných identifikačních markerů. Folikuly s terminálními vlasy, právě tak, jako vlasy samé, skýtají dermatofytům živnou půdu. Mikroskopický projev dermatophyt je důležitý z hlediska orientační klasifikace. Determinaci taxonomickou lze provést pouze kultivačním vyšetřením. Tato problematika však už nespadá do pracovní náplně naší laboratoře.

Trichologický materiál vystavený taphonomickým faktorům (v různých typech půd, písku, kompostu apod.) je napadán několika typy keratofilních plísní. Mikroskopický obraz, charakteristický vytvářením chodbiček nebo kavit, nám pomáhá v taxonomické determinaci. Podobná poškození nenalzáme u vlasů napadených plísněmi *in vivo*.

Proteomika – principy, metody a aplikace

JAROSLAV WEISER

MBÚ AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4 - Krč, ČR

Tel.: 241062378, e-mail: weiser@biomed.cas.cz

Proteomika jako jedna z nově vzniklých disciplin takzvané globální molekulární biologie prodělala v posledních letech velmi dynamický vývoj, který čerpá z neobyčejného rozmachu genomiky. Obrovské množství sekvenčních dat odhalujících struktury stále většího počtu genomů jak prokaryotních tak i eukaryotních organismů vyvolává potřebu efektivních a vysokokapacitních technologií dovolujících přiřazení funkcí jednotlivým genovým strukturám a odhalujících jejich vzájemnou interakci a regulaci jejich exprese. Takové požadavky splňuje právě proteomika, která umožňuje sledovat současně většinu proteinů v buňce nebo tkáni a určit jak jejich identitu tak i úroveň jejich exprese danou jejich koncentrací v čase a prostoru. V kombinaci se znalostí kompletní sekvence genomu daného organismu pak umožňuje porozumět jednotlivým funkčním a regulačním genovým sítím a kaskádám. Spolu s analýzou exprese genů na úrovni mRNA (transkriptomika) dovoluje vytvářet globální modely funkce buněk a tkání jednotlivých organismů.

Základní metodický arsenál proteomiky představují jednak techniky pro separaci proteinů a jejich detekci ve velmi komplexních směsích, dále techniky pro identifikaci jednotlivých proteinů a jejich přiřazení ke kódujícím DNA sekvencím. V neposlední řadě je to i bioinformatika umožňující zpracování obrovského množství takto získaných dat jejich analýzu a modelování biologických procesů, které reprezentují. Dominantní postavení v separačních technikách si stále udržuje vysokorozlišovací dvojrozměrná (2D) elektroforéza proteinů často v kombinaci s moderními chromatografickými separačními metodami. Nicméně objevují se i nové metody, které do značné míry mohou 2D elektroforézu nahradit. V oblasti identifikace proteinů zcela dominantní roli hraje hmotnostní spektrometrie, která dovoluje jednoznačně určit identitu proteinu na základě porovnání hmotností z něj generovaných ionizovaných peptidů s hmotností stejných peptidů odvozených z jejich DNA sekvence. Využití hmotnostní spektrometrie v proteomice vedlo i k výraznému rozvoji této disciplíny samotné a k výraznému snížení cen hmotnostních spektrometrů.

Proteomika rozhodujícím způsobem ovlivňuje nejen základní výzkum a vytváří nové koncepty studia struktury a funkce biologických systémů, ale také zcela zásadním způsobem začíná ovlivňovat rozvoj biotechnologií a biomedicíny zejména v oblasti vývoje nových léčiv, diagnostických postupů a objasňování molekulárních základů vzniku onemocnění. Významným způsobem se také podílí na vývoji nových laboratorních metod a přístrojů.

V současné době kdy se zdá být rozvoj tohoto oboru právě na vrcholu, se začíná rýsovat několik základních směrů v perspektivách dalšího směřování proteomiky. Jednak velmi brzy dojde k prolínání dvou základních konceptů proteomiky, popisného přiřazujícího jednotlivé proteiny k příslušným genům a kvantitativního sledujícího dynamiku exprese genů v čase a prostoru. Zároveň dochází k oddělení vysoko-kapacitní automatizované robotizované proteomiky provozované zejména velkými biotechnologickými firmami a některými velkými a bohatými laboratořemi od podstatně méně finančně a přístrojově náročné proteomiky v běžných akademických institucích. Zatímco průmysl hledá v proteomice rychlou návratnost velkých investic ve formě nových léčiv a diagnostických postupů, pro akademické instituce se otevírá obrovské množství možností využít v současnosti velmi rozvinuté proteomové technologie v menších konkrétně zacílených projektech studujících nejrůznější dílčí biologické problémy a vyžadující spíše než automatizované továrny na proteomy velkou dávku „přidaného mozku“ badatele.

Doporučená literatura:

- Dutt, M. J. and Lee, K. H.: 2000 - *Curr Opin Biotechnol* 11: 176-9.
 Fey, S. J. and Larsen, P. M.: 2001 - *Curr Opin Chem Biol* 5: 26-33.
 Mann, M., Hendrickson, R. C. and Pandey, A.: 2001 - *Annu. Rev. Biochem.* 70: 437-473.
 van Wijk, K. J.: 2001 - *Plant Physiol* 126: 501-8.
 Kersten, B., Burkle, L., Kuhn, E. J., et al.: 2002 - *Plant Mol Biol* 48: 133-41.
 Koonin, E. V., Wolf, Y. I. and Karev, G. P.: 2002 - *Nature*, 420, 218-23.
 MacBeath, G.: 2002 - *Nat Genet* 32 Suppl.: 526-32.
 Roberts, J. K.: 2002 - *Plant Mol Biol* 48: 143-54.
 Thiellement, H., Zivy, M. and Plomion, C.: 2002 - *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 782: 137-49.
 Xing, T., Ouellet, T. and Miki, B. L.: 2002 - *Trends Plant Sci* 7: 224-30.
 Yarnush, M. L. and Jayaraman, A.: 2002 - *Annu Rev Biomed Eng* 4: 349-73.
 Phizicky, E., Bastiaens, P. I., Zhu, H. et al.: 2003 - *Nature* 422: 208-15.
 Taylor, S. W., Fahy, E. and Ghosh, S. S.: 2003 - *Trends Biotechnol* 21: 82-8.

Kvasinkový dvouhybridní systém

BŘETISLAV BAVLNKA

ÚEB AVČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6-Lysolaje, ČR

Tel.: 220390449, e-mail: bavlnka@ueb.cas.cz

Klíčem k bližšímu poznání biologickým procesů, jako je např. přenos signálu nebo transkripce, je poznání vzájemných interakcí mezi proteiny. Jednou z velice účinných metod využívaných ke studiu protein-proteinových interakcí *in vitro* je kvasinkový 2-hybridní systém.

První kvasinkový 2-hybridní systém popsali Fields a Song (1989). Princip metody je založen na faktu, že mnoho eukaryotických transkripčních faktorů se skládá ze dvou oddělitelných a funkčně nezávislých domén. Např. kvasinkový GAL4 transkripční aktivátor je tvořen DNA-vazebnou doménou (DNA-BD) a transkripční aktivační doménou (AD). Geny kódující potenciálně interagující proteiny jsou ve fázi ligovány do vektorů obsahující jednotlivé domény. Vektory je transformován příslušný kvasinkový kmen a dochází ke koexpresi rekombinantních hybridních proteinů. Případná proteinová interakce má za následek funkční rekonstrukci GAL4 aktivačního faktoru a je provázena fenotypově detekovatelnou aktivací transkripce reportérových genů (např. lacZ, HIS3).

Kvasinkový 2-hybridní systém má oproti biochemickým metodám (koimunoprecipitace, afinitní chromatografie) několik významných výhod - je relativně levný, umožňuje jednoduchý screening expresních knihoven a získání cDNA, má větší senzitivitu než *in vitro* techniky.

Za dobu od svého objevení se tato metoda stala rutinním nástrojem pro studium proteinových interakcí a byla různým způsobem modifikována. Vedle klasického 2-hybridního systému reprezentovaného GAL4 a LexA systémem existuje široké spektrum modifikací (např. hSos/Ras recruitment system, Split-ubiquitin system, Three-protein system, Small ligand-dependent system, Dual-bait system).

Fields S., Song O.-K.: 1989 - Nature 340: 245-246

Podporováno grantem GAČR 204/02/1461 a výzkumným centrem MŠMT SIDROS (LN 00A081)

Rychlá izolace rostlinných mitochondrií z malého množství výchozího materiálu pro analýzu proteinů

TOMÁŠ HÁJEK^{1,2}, VĚRA ČAPKOVÁ^{1,2}

¹ ÚEB AVČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha - 6 Lysolaje

² Př F UK, katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, Praha 2

Tel.: 220390451-2, e-mail: hajtom@ueb.cas.cz

Při izolaci mitochondrií a následně jejich proteinů z rostlinných pletiv je možné narazit na několik komplikací. 1. nízkou efektivitu homogenizace, 2. kontaminaci mitochondriální frakce buněčným materiálem 3. potíže s odstraněním Percollu po odebrání hustotního gradientu 4. nedostatečnou čistotu extrahovaných mitochondriálních proteinů. Následující metoda odstraňuje všechny uvedené problémy.

Homogenizace je založena na střízných silách mezi dvěma nylonovými síty. Jedno je stabilní, umístěné na potravinové fólii a na měkké podložce, druhé je připevněno k hříbovitému nástavci mixeru. K homogenizaci 0,1 - 1g rostlinného pletiva navlhčeného pufrem pak dostačuje 30 sekund tření. Odpipetováním roztoku z fólie pod sítem se získá homogenát s rostlinnými částicemi nepřesahujícími velikost ok spodního nylonového síta (45µm).

Před nanesením homogenátu na Percollový gradient je nutné jeho předčištění 5 minutovou centrifugací při 2 a 6 tis g., kdy ještě nedochází k sedimentaci mitochondrií a těžké buněčné struktury jsou odstraněny v sedimentu.

Takto předčištěný supernatant se nanáší na Percollové médium, kde se po 80 minutách centrifugace při 40 tis g vytváří prstenec zaputovaných mitochondrií a v horní části zkumavky zůstává cytoplazmatická frakce bez vyšších buněčných struktur. Pro odstranění Percollu z odebraných mitochondrií se nejlépe osvědčila filtrace celého roztoku přes nenabitý nylonový filtr 0,22 µm. Po opláchnutí filtru promývacím médiem tak zůstávají zachyceny pouze mitochondrie (velikost 0,5 µm).

Pro získání proteinů ze zachycených mitochondrií je nejlepší převrstvení celého filtru fenolem, a následně přidání chloroformu. Chloroformem sražené proteiny vytvoří nad nepolárním roztokem prstenec. Fenol-chloroformový roztok s rozpuštěným nylonovým filtrem a lipidy se odstraní, stejně jako slabá vodná fáze s nukleovými kyselinami a solemi. Proteiny po opakovaném promytí fenol-chloroformem a samotným fenolem mají po vysušení vysokou čistotu vhodnou pro 2D-SDS-PAGE a další proteomickou analýzu.

Podporováno grantem Ministerstva školství a tělovýchovy č. CE:JI3/98:113100003.

Konstrukce syntetického tabáku

KAMILA SKALICKÁ, ROMAN MATYÁŠEK, ALEŠ KOVAŘÍK

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř molekulární epigenetiky, Královopolská 135, 61265 Brno

Tel.: 541 517 179, e-mail: skalicka@ibp.cz

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 247

Způsoby detekce polymorfismu homologních DNA a jejich využití při studiu změn ve struktuře rodičovských genomů u modelových allotetraploidních druhů rodu *Nicotiana* a *Tragopogon*

ROMAN MATYÁŠEK, KAMILA SKALICKÁ, ALEŠ KOVAŘÍK

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř molekulární epigenetiky, Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel.: 541 517 230, e-mail: matyasek@ibp.cz

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 207

LC-NMR - principy a použití

JAN SCHRAML

ÚCHP AVČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, ČR

Tel.: 220390315, e-mail: schraml@icpf.cas.cz

Hybridní technika LC-NMR představuje synergetické spojení nejúčinnější separační techniky (HPLC, vysoceúčinné kapalinové chromatografie) s jednou z nejúčinnějších metod pro určování struktury látek (NMR, nukleární magnetická rezonance). V tomto spojení jsou, při zachování vlastností chromatografie (versatilita), podstatně zmírněna omezení NMR spektroskopie – požadavek čistých látek a nízká citlivost metody.

Pracovní principy a možnosti použití budou demonstrovány na LC-NMR spektrometru Varian INOVA 500 instalovaném v minulém roce na Ústavu chemických procesů AV ČR.

Podporováno grantem GA AVČR IAA4072005.

Analýza genomu rostlin pomocí průtokové cytometrie

JAN BARTOŠ, MARIE KUBALÁKOVÁ, JAN ŠAFÁŘ, JAROSLAV JANDA, PAVLÍNA KOVÁŘOVÁ, JARMILA ČÍHALÍKOVÁ, MIROSLAV VALÁRIK, HANA ŠIMKOVÁ, JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 77200 Olomouc
Tel.: 585 228 521, e-mail: dolezel@ueb.cas.cz

První publikovaná práce o využití průtokové cytometrie pro analýzu rostlinného materiálu pochází z roku 1976. Skutečný nástup do oblasti rostlinné biologie však průtoková cytometrie zaznamenala až začátkem osmdesátých let dvacátého století, po zveřejnění účinné metody izolace buněčných jader. Analýza obsahu jaderné DNA zůstává i dnes nejpoužívanější metodou s obrovským rozsahem aplikací, zahrnujících základní a aplikovaný výzkum, šlechtění a množení osiv. K nejnáročnějším aplikacím patří mapování jaderného genomu pomocí tříděných chromozómů. Analýza a třídění chromozómů byly dlouho komplikovány problémy s přípravou suspenzí intaktních chromozómů. Ty se podařilo vyřešit zavedením metody izolace chromozómů z kořenových meristémů. Potíže s rozlišením jednotlivých typů chromozómů byly překonány využitím materiálů s chromozómovými translokacemi, delecemi a adicemi. V současné době jsou k dispozici postupy pro třídění chromozómů hlavních zástupců luštěnin, obilnin a některých dalších druhů rostlin. Tříděné chromozómy byly použity pro studium genomické distribuce sekvencí DNA pomocí PCR *in situ* a fluorescenční *in situ* hybridizace, pro fyzické mapování sekvencí DNA pomocí PCR a pro lokalizaci chromozomálních proteinů. Významnou aplikaci představuje cílená izolace molekulárních markerů z definovaných oblastí genomu. Za přelomový výsledek lze označit zvládnutí metody konstrukce chromozómově specifických knihoven DNA klonovaných ve vektoru BAC. Dostupnost těchto knihoven podstatně zjednoduší a urychlí fyzické mapování velkých genomů kulturních plodin a izolaci agronomicky významných genů.

Podporováno Grantovou agenturou AV ČR (IAA 6038204), Grantovou agenturou ČR (521/03/0595 a 522/03/0354), Národní agenturou pro zemědělský výzkum (QC1336) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (ME 527 a ME 528).

Dvoufotonová konfokální mikroskopie

LUCIE KUBÍNOVÁ, FRANCESCO DIFATO, BARBORA RADOCHOVÁ, PETR KAREN, JIŘÍ JANÁČEK

FgÚ AVČR, Videňská 1083, 14220 Praha 4 - Krč, ČR

Tel.: 241062314, e-mail: kubinova@biomed.cas.cz

Dvoufotonový mikroskop představuje nový typ konfokálního mikroskopu (Denk et al., 1990, Diaspro, 2002). Od „klasického“ laserového konfokálního mikroskopu se odlišuje tím, že místo jednofotonové excitace využívá excitace dvěma fotony, které jsou absorbovány prakticky současně, tedy v jediném kvantovém okamžiku. Toto je možné zabezpečit pouze pomocí speciálního laseru, který vysílá fotony s šířkou pulsu řádově 100 femtosekund. Energie fotonů se sčítají, a proto je při dvoufotonové excitaci vlnová délka vysílaného záření zhruba dvojnásobná než u jednofotonové excitace. Pravděpodobnost dvoufotonové excitace je úměrná druhé mocnině intenzity excitačního pole, která je nejvyšší v ohnisku objektivu. K excitaci tak dochází pouze v rovině zaostření, a proto k získání obrazů optických řezů vzorkem nepotřebujeme odstiňovat obraz z nezaostřených míst pomocí konfokální clonky, jako je tomu u „klasického“ jednofotonového konfokálního mikroskopu. Vzorek je tak ozařován pouze bodově a zhášení fluorochromů v nezaostřených místech vzorku je výrazně omezeno.

Mezi hlavní výhody dvoufotonové mikroskopie ve srovnání s klasickou konfokální mikroskopií patří:

- výrazně menší zhášení fluorochromů v celé tloušťce vzorku
- větší hloubka proostření (až do 400 μ m) i u vzorků, jejichž povrchové vrstvy vykazují silnou fluorescenci
- zvýšený podíl signálu k šumu (signal/noise ratio), tedy kontrastnější obrazy, zejména ve větších hloubkách vzorku
- snížená fototoxická, umožňující krátko- i dlouhodobé pozorování živých buněk a tkání i při použití fluorochromů s UV excitací
- excitace laditelná v rozmezí od UV do modrozelené oblasti (700-1000 nm) bez speciální optiky nutné při excitaci UV lasery
- lepší možnosti detekce jednotlivých molekul, např. metodou FRET (fluorescence resonance energy transfer)

Dvoufotonová mikroskopie má široké využití v mnoha biologických oborech. Umožňuje získávat tenké optické řezy buňkami či tkáněmi a zobrazit jejich různé komponenty s využitím vícenásobného barvení. Při fyziologických studiích bývají často využívány časové série, zaznamenávající časové změny např. v koncentraci různých iontů v různých oblastech studovaného vzorku. Digitální obrazy sérií optických řezů představují data vhodná pro kvantitativní měření i pro počítačové trojrozměrné rekonstrukce relativně velkých oblastí vzorku, aniž by bylo nutné řešit problém lícování následných fyzických sériových řezů (Pawley, 1995).

V přednášce budou diskutována některá úskalí, kterým je třeba čelit při praktickém používání dvoufotonové excitace, např. jaké barvení je vhodné či jak zabránit přehřátí vzorku, ke kterému může dojít z různých příčin, jako je příliš velká intenzita budícího laserového záření či absorpce infračerveného záření některou složkou vzorku.

Denk W., Strickler J.H., Webb W.W.: 1990 - Science 248: 73-76

Diaspro A.: Confocal and Two-photon Microscopy. Wiley-Liss, New York, 2002

Pawley J.B.: Handbook of Biological Confocal Microscopy. Second Edition. Plenum Press, New York, 1995

Podporováno granty GAČR č.304/01/0257 a GA AVČR č.B6011309.

Moderní metody elektronové mikroskopie

PAVEL HOZÁK

ÚEM AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4 - Krč

Tel.: 241062219, e-mail: hozak@biomed.cas.cz

Elektronová mikroskopie představuje v biologii již klasickou techniku, která zejména ve svých „biologických“ začátcích v šedesátých letech přispěla k pochopení buněčné a tkáňové struktury. Postupně se pak elektronová mikroskopie stala nezbytným nástrojem studií v cytologii, histologii, molekulární biologii a biologii strukturální. V postgenomické éře se transmisní elektronová mikroskopie stává středem zájmu biologů díky své schopnosti lokalizovat ve vzorku i jednotlivé proteinové molekuly. V příspěvku budou shrnuty současné možnosti využití nejnovějších trendů transmisní elektronové mikroskopie v biologii – ultrastrukturální tomografie ve spojení s prvkovou analýzou pomocí EDX a EELS. Diskutovány budou experimentální možnosti využití ultrastrukturálního imunozačnění pomocí koloidního zlata ve spojení s progresivními stereologickými přístupy.

Mikroskopické metódy sledovania príjmu a akumulácie hliníka v koreňoch *Arabidopsis thaliana*

PETER ILLÉS¹, MIROSLAV OVEČKA^{1,2}, IRENE LICHTSCHEIDL²

¹ Botanický ústav SAV, Dúbravská cesta 14, 845 23 Bratislava, Slovenská republika

² Institut für Ökologie und Naturschutz, Universität Wien, Althanstr. 14, A-1090 Wien, Österreich

Tel.: ++(421 2) 59426 102, e-mail: peter.illes@savba.sk

Mechanizmus účinku hliníka nie je doteraz veľmi dobre preskúmaný, ale je známe, že primárnym miestom jeho pôsobenia je apex koreňa. Z doterajšieho výskumu vyplýva, že na prítomnosť hliníka najcitlivejšie reaguje tzv. "transition zone" koreňovej špičky a prvé fyziologické odpovede sú pozorované už po veľmi krátkom pôsobení. Toxicita hliníka sa prejavuje spomalením rastu koreňa ako dôsledku inhibície elongácie buniek, alebo úplného zastavenia mitotickej aktivity meristematických buniek.

Práce zaoberajúce sa dynamikou príjmu a akumulácie hliníka v krátkom časovom období od jeho aplikácie boli doteraz publikované iba v minimálnej miere. Väčšina autorov sa zaoberala pozorovaním distribúcie hliníka v dlhšom časovom intervale (24 h) a aj tieto informácie nie sú jednotné. Preto sme sa v našich experimentoch zamerali práve na sledovanie príjmu a akumulácie hliníka v krátkom časovom intervale.

Na detekciu hliníka sme použili dnes už klasickú metódu farbenia pomocou morínu. Zvolená koncentrácia hliníka (50 μ M AlCl₃) indukovala miernu inhibíciu rastu koreňa. Výsledky ukazujú, že v prvých štádiách (do 1 h) je hliník lokalizovaný v apoplaste. Už po 1,5 h pozorujeme signál aj v cytoplazme a po 3-4 h od pôsobenia je hliník lokalizovaný vo vakuolárnom kompartmente bunky. Na dôkaz, že sa jedná skutočne o vakuolárny kompartment, sme použili špecifické farbenie endomembránového systému pomocou FM 4-64 (selektívne styrylové farbivo značiace endomembránové štruktúry). Pozorovania a následná kolokalizácia morínu a FM 4-64 dokazuje, že časť hliníku sa po 4 h síce ešte nachádza v bunkových stenách, ale väčšina symplastického hliníka je už lokalizovaná v provakuolách a vakuolách meristematických buniek a buniek „transition zone“. V bunkách elongačnej zóny a v diferencovaných bunkách nedochádza k vstupu hliníka do vnútra bunky, zostáva v apoplaste. Všetky experimenty prebiehali na živých koreňoch v reálnom čase a boli vyhodnocované pomocou konfokálneho mikroskopu.

Touto pomerne jednoduchou a nenáročnou metódou sme popísali dynamiku príjmu a lokalizácie hliníka, ako dôležitých faktorov v štúdiu skorých odpovedí rastliny na stres vyvolaný týmto kovom. Skĺbením živého objektu, vhodných vitálnych farbív a konfokálnej mikroskopie sme ukázali fungujúci systém poskytujúci mnohé výhody v porovnaní s doteraz využívanými postupmi (fixovaný materiál pre elektrónovú a svetelnú mikroskopiu) pri skúmaní problematiky príjmu hliníka rastlinou.

Práca je podporovaná grantovou agentúrou VEGA, grant č. 2031 a grantom Európskej Únie TIPNET (HPRN-CT-2002-00265).

Histochemické metody stanovení patologických změn v listech rostlin v průběhu patogenese biotrofních houbových parazitů

KATEŘINA MLÍČKOVÁ^{1,2}, MICHAELA SEDLÁŘOVÁ¹, LENKA LUHOVÁ², PAVEL PEČ², ALEŠ LEBEDA¹

¹Katedra botaniky a ²Katedra biochemie, PřF UP, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice
Tel.: 585 634 925, e-mail: katrynka@email.cz, sedlarova@prfholnt.upol.cz

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 212

Nová metoda měření propustnosti průduchové kutikuly izolované z listů břečťanu (*Hedera helix* L.)

JIRÍ ŠANTRŮČEK^{1,2}, EVA ŠIMÁNOVÁ³, JANA KARBULKOVÁ², MARIE ŠIMKOVÁ¹, LUKAS SCHREIBER³

¹ Ústav molekulární biologie rostlin, AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika

² Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika

³ Botanical Institute, University of Bonn, Kirschallee 1, 531 15 Bonn, Germany

Fax: +420 38 777 2371, e-mail: jsan@umbr.cas.cz

Rostlinná kutikula vytváří bariéru chránící rostlinu před nadměrnou ztrátou vody a patogeny. Při nedostatku vody, kdy jsou průduchy (stomata) uzavřeny, je výměna vody mezi rostlinou a atmosférou uskutečňována výhradně přes kutikulu. Transportní vlastnosti rostlinné kutikuly pro vodu a organické látky byly studovány na listových terčích, izolovaných rostlinných kutikulách nebo extrahovaných kutikulárních a epikutikulárních voscích. Zejména izolované kutikuly se ukázaly být velmi užitečným modelem pro studium propustnosti. Nicméně, všechny metody využívající izolované kutikuly jsou výrazně omezeny – nelze jimi zkoumat průduchové kutikuly, protože není možné rozlišit transport pevnou složkou kutikuly od transportu průduchovými póry. Ovšem stomatální kutikuly mají velký fyziologický význam. Proto jsme vyvinuli novou metodu, umožňující měření transpirace přes průduchové kutikuly.

Metoda je založena na skutečnosti, že rychlost difuze vodní páry plynem vyplněnými stomatálními póry se v různých plynech liší, zatímco difuze přes pevnou kutikulu zůstává stejná, nezávislá na okolním inertním plynu. Např. poměr rychlostí difuze vody v heliu a dusíku je dán pouze poměrem difusivit vodní páry v obou plynech, který je 3.6 pro He/N. Naproti tomu transport vody přes pevnou fázi kutikuly zůstává stejný v dusíku i v heliu. V experimentech jsme použili kutikulární membrány (KM) ze svrchní (adaxiální) a spodní (abaxiální) strany listu břečťanu (*Hedera helix* L.), izolované metodou popsanou Schönherrem a Riedererem (1986), usušené a uskladněné při pokojové teplotě. Membrány polymerové matrix (MX) byly získány z KM extrakcí vosků v chloroformu. Nově vyvinuté transportní komůrky umožnily měření rychlosti difuze triciované vody (³H₂O) z donorové komůrky přes studovanou porézní membránu a prostor vyplněný daným plynem k akceptoru, kterým byl terčik filtračního papíru (o průměru 10 mm) navlhčený deionizovanou vodou. Množství radioaktivity (molekul ³H₂O) prošlé do akceptoru bylo stanoveno na scintilačním počítači. Každá KM i MX byla měřena v obou plynech. Jako kontrolu jsme použili prázdnou komůrku a komůrku zakrytou parafilmem. Propustnost kutikuly pro vodu jsme vypočetli z rychlosti toku vody, zjištěné ze sklonu přímkové závislosti radioaktivity akceptoru na čase.

Vodní tok přes stomatální kutikulu byl asi 25-krát vyšší než tok přes astomatální kutikulu. Ale pouze 35% nárůstu mají na svědomí stomatální póry. Difusní vodivost pevné fáze stomatální kutikuly byla asi 11-krát vyšší než vodivost nestomatální kutikuly. To znamená, že pevná kutikula stomatální (abaxiální, spodní) strany listu byla 11-krát propustnější pro vodu než pevná kutikula astomatální (adaxiální, svrchní) strany listu. Tok přes obě, jak stomatální tak astomatální, kutikuly vzrostl po extrakci vosků. Vzhledem k tomu, že rozdíl v celkových tocích přes KM a MX v dusíku byl jiný než v heliu, muselo během extrakce vosků dojít ke vytvoření dalších plynem vyplněných pórů, kterými mohla difundovat vodní pára. Domníváme se, že kutikulární membrána obsahuje póry vyplněné voskem, které se během extrakce vosku uvolní. Naše zjištění, pokud se potvrdí, by mohly mít význam pro reakci průduchů rostlin na vlhkost vzduchu.

J. Šantrůček, E. Šimánová, J. Karbalková, M. Šimková, L. Schreiber - J. of Exp. Botany (v přípravě)

J. Schönherr, M. Riederer: 1986 – Plant, Cell and Environment 9: 459-466

Project byl financován z grantů Akademie věd České republiky (A6051002), Ministerstva školství České republiky (ME 368, MSM 123100004, LN00A141), a z grantů institucí Bundesministerium für Bildung und Forschung (TSR-001-99), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) a Fonds der Chemischen Industrie (FCI)

ABSTRAKTY PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ

Možnosti exprese cizích genů pomocí vektorů založených na rostlinných viřech

NOEMI ČEROVSKÁ, TAMARA PEČENKOVÁ, HELENA SYNKOVÁ, TOMÁŠ MORAVEC, JIŘÍ VELEMÍNSKÝ

ÚEB AV ČR, Na Karlovce 1, 16000 Praha 6, ČR

Tel:233320338, e-mail: cerovska@ueb.cas.cz

Užití rostlin jako expresních systémů pro přípravu rekombinantních proteinů je ve většině případů založeno na integraci transgenů do rostlinného genomu. Bohužel, tento postup vede velmi často k rozdílné expresi transgenů v různých rostlinných liniích, které jsou odvozeny od stejného konstruktů (Hobbs et al., 1990). Alternativní přístup je založen na transienčních expresních systémech, které se pro svou rychlost, flexibilitu a možnosti užití v plně diferencovaných rostlinných pletivech, stále více využívají (Fisher et al., 1999). Transienční systémy používající rostlinné virové vektory umožňují expresi cizích genů v infikovaných pletivech v koncentracích, které jsou v normálním případě vyšší než u transformovaných rostlin (Yusibov et al., 1999).

Pro účely exprese cizích genů bylo připraveno několik vektorů, kde se využila cDNA úplné délky odvozená z RNA rostlinného viru, vektor dále obsahuje mnohočetné klonovací místo připojené většinou ke genu pro obalový protein viru. Virová cDNA je připojena k silným promotorům (T7 nebo CaMV 35S) a k „nos ter“ oblasti, transkripčnímu terminátoru z genu pro nopalín syntasů z *Agrobacterium tumefaciens* (Angell and Baulcombe, 1997).

V našem projektu se zaměřujeme na expresi heterologních proteinů v rostlinné hostitelské buňce pomocí virového expresního vektoru založeného na X viru bramboru (PVX), označeném pGR106. V první fázi se snažíme optimalizovat podmínky exprese vedoucí ke zvýšení výtěžku heterologního proteinu. Jako modelový protein jsme vybrali obalový protein A viru bramboru (PVA-CP), protože máme polyklonální i monoklonální protilátky umožňující detekci tohoto proteinu. Dále se analyzovala přítomnost PVA-CP RNA v infikovaných rostlinách a tvorba samopolymerních viru podobných částic PVA v rostlinných pletivech.

Byly navrženy primery pro klonování PVA-CP do plazmidu vhodného pro expresi v *E.coli* a pro reklonování do PVX vektoru. Dále jsme optimalizovali metodu infekce rostlinného materiálu (výběr hostitelské rostliny, různé způsoby inokulace v přítomnosti i bez *Agrobacteria*), podmínky pro propagaci materiálu (interval pasážování), metody skríníngu rostlinného materiálu pomocí ELISA, Westernblotu a RT PCR testů.

Náš příspěvek shrnuje první výsledky získané v naší laboratoři týkající se rostlinných virových expresních vektorů. K dalšímu zvýšení hladiny exprese cizích genů hodláme analyzovat vliv některých nestrukturálních proteinů *Potyvirusů* a synergistické infekce rostlinného vektoru a dalších virů na expresi.

Doufáme, že vzhledem k jednoduchosti a rychlosti tohoto postupu exprese heterologních proteinů v rostlinách, se tento postup po vypracování optimálních podmínek bude využívat jak v průmyslovém měřítku, tak poslouží pro výzkum a biochemickou charakterizaci širokého spektra proteinů.

Tato práce byla podporována grantem č. 310/00/0381 GAČR.

Angell SM., Baulcombe DC. :1997- EMBO J 16 (12):3675-84

Fischer R., Vaquero-Martin C., Sack M., Drossard J., Emans N., Commandeur U.: 1999- Biotechnol.Appl. Biochem 30: 113-116

Hobbs SL., Kpodar P., DeLong CM.: 1990- Plant Mol Biol 15(6):851-64

Yusibov V., Shiprasad S., Turpen TH., Dawson W., Koprowski H.: 1999- Curr.Topics Microbiol.Immunol. 240: 81-94.

Extrakce, čištění a stanovení auxinu a kyseliny abscisové pomocí dvou-dimenzionální vysokoúčinné kapalinové chromatografie

PETRE IVANOV DOBREV A MIROSLAV KAMÍNEK

ÚEB AV ČR, Rozvojová 135, 16502, Praha 6

Tel: +420 2 20390444; Fax: +420 2 20390446; e-mail: dobrev@ueb.cas.cz

Rostlinné hormony mají velmi důležitou úlohu při řízení a koordinaci růstu a vývoje rostlin. V nepatrných koncentracích iniciují či stimulují základní vývojové procesy jako dělení a zvětšování buněk, diferenciace orgánů, dormance a klíčení semen apod. Izolace a stanovení různých fytohormonů jsou potřebné při studiu jejich metabolismu, mechanismů působení i fyziologických funkcí.

V naší předchozí práci jsme vyvinuli jednoduchou a účinnou metodu extrakce a čištění rostlinných hormonů typu auxinu (kyselina indolyl-3-octová, IAA), cytokininů a kyseliny abscisové (ABA) (P. I. Dobrev and M. Kamínek [2002] J. Chromatogr. A 950:21-29). Tato metoda umožnila přípravu velmi čisté frakce cytokininů, ale frakce obsahující koelující směs IAA a ABA obsahovala značné množství fluoreskujících a UV světlo absorbujících nečistot, které znemožňovaly jejich správnou kvantifikaci pomocí fluorescenční fotometrie (IAA) či hmotnostní spektrometrie (IAA a ABA). K překonání této překážky jsme vypracovali novou metodu založenou na dvourozměrné vysokoúčinné chromatografii (2D-HPLC), která umožňuje přípravu velmi čistých preparátů IAA a ABA a tak zvýšit spolehlivost a přesnost jejich kvantifikace.

Uspořádání 2D-HPLC obsahuje dvě gradientové HPLC pumpy, dvě kolony s odlišnou náplní a detektory fluorescence a diodového pole. V obou dimenzích lze použít stejný průtok (0.6 ml min^{-1}) a stejnou mobilní fázi (A: 40mM kyselina mravenčí, pH je upraveno hydroxydem amonným na hodnotu 3 a B: acetonitril/metanol, 1/1, v/v). Eluát z druhé kolony byl monitorován v tandemu napojenými detektory diodového pole (detekce IAA a ABA) a fluorescence (IAA).

V první dimenzi byl vzorek aplikován na první kolonu obsahující silikagelovou náplň s kovalentně navázanými kyanopropylými skupinami (ACE-CN, 150x4,6mm, 3 μm , A.C.T.). K eluci byl použit lineární gradient 10%B – 40%B během 15 min. IAA a ABA byly eluovány velmi blízko, což umožnilo jejich jímání do jedné 1 ml smyčky a po přepnutí ventilu převést velmi úzký úsek chromatogramu obsahující oba hormony do druhé dimenze. Ta obsahovala druhou kolonu se silikagelem s navázanými C_{18} skupinami (Luna C18(2), 150x4,6mm, 3 μm , Phenomenex) k již eluci byl použit lineární gradient 45%B – 100%B v průběhu 10 min. Za těchto podmínek byly oba hormony velmi dobře odděleny a dostatečně vzdáleny od čela chromatogramu s faktory kapacity > 2 a rozlišení (R_s) ≈ 4 . Toto uspořádání umožnilo nástřik vzorků v intervalech kratších než 30 min.

Uvedená 2D-HPLC umožnila získat velmi čisté preparáty IAA a ABA v oddělených frakcích a přímou „on line“ kvantifikaci IAA. Pro kvantifikaci vyčištěné ABA lze použít HPLC/MS, GC/MS či některou z imunologických metod. 2D-HPLC jsme úspěšně použili pro stanovení IAA v obilkách pšenice sklizených v různou dobu po opylení. Její hodnoty odpovídají výsledkům získaným pomocí dříve používané pracovně náročné metody čištění pomocí sloupcové kapalinové chromatografie na DEAE Sephadexu a Si-C_{18} sorbentu a vyznačují se menším rozptylem hodnot paralelních stanovení.

Poděkování: Tato práce byla umožněna díky finanční podpoře poskytnuté GA ČR (granty č. 522/02/D058 a 522/02/0530) a MŠMT (grant č. LN00A081).

Standardní molekulární techniky pro analýzu transgenních rostlin: Izolace DNA a PCR reakce

EVA HALÁMKOVÁ

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 772 00 Olomouc, ČR
Tel: 585228521, e-mail: halamkova@ueb.cas.cz

Extrakce DNA je klíčovým krokem při jakékoliv analýze rostlinného genomu na molekulární úrovni. Volba metody izolace závisí na záměru s jakým je DNA izolována, především na požadovaném množství a čistotě DNA. Pro stanovení přítomnosti transgenu pomocí PCR byla zvolena izolace DNA pomocí Plant DNAzol. Metoda izolace pomocí DNAzol je založena na využití guanidin-detergent lyzujícím roztoku, který hydrolyzuje RNA a umožňuje selektivní přesrážení DNA z lyzátu.

Zřejmě nejvyužívanější metodou současné molekulární biologie je PCR (Polymerase Chain Reaction). PCR je cyklovaná reakce o třech teplotních fázích, při které termostabilní DNA polymeráza namnoží úsek mezi dvěma specifickými oligonukleotidy (primery). V průběhu každého cyklu dochází postupně k denaturaci (rozvolnění dvoušroubovicové molekuly DNA), nasedání (anealaci) primerů a prodlužování (extenzi) řetězce. Po 30 cyklech je úsek mezi primery namnožen 230. Vizualizace PCR produktu - používá se tzv. elektroforéza, kdy elektrický proud procházející gelovým nosičem strhává nukleové kyseliny. K separaci PCR produktů dochází díky rozdílné pohyblivosti molekul v závislosti na jejich molekulové hmotnosti (u DNA v závislosti na počtu páru bází) - kratší molekuly s nižší molekulovou hmotností jsou pohyblivější než delší. Výsledky lze fotografovat a archivovat.

Pro studium exprese a stability transgenů jsou využívány výše uvedené standardní molekulární techniky.

Pracovní postup:

Izolace DNA pomocí DNA zolu

Roztoky k izolaci: Plant DNAzol Reagent, ethanol, TE pufr (pH=8) nebo 8mM NaOH a chloroform.

Extrakce DNA:

1. 100 mg rostlinného materiálu nastříháme na kousky a rozetřeme na prášek v dobře vychlazené eppendorfce v tekutém dusíku.
2. Přidáme 300 µl Plant DNAzol Reagent, převrátíme eppendorfkou několikrát a inkubujeme 5 min při pokojové teplotě (25°C).
3. Přidáme 300 µl chloroform: isoamylalkohol (24:1), důkladně promícháme.
4. Centrifugujeme při 12 000 ot/min po dobu 10 minut.
5. Odebereme supernatant (vrchní fáze nad fází chloroformovou) do nové eppendorfkou.

Přesrážení DNA:

6. Přidáme 225 µl 96 % ethanolu, převrátíme eppendorfkou 6-8krát a inkubujeme 5 min při pokojové teplotě (25°C).
7. Centrifugujeme 8 000 ot/min, 4 minut
8. Odsavujeme supernatant.

Promytí DNA:

9. Připravíme si DNAzol-ethanol mix – 1 díl Plant DNAzolu s 0.75 díly 96 % ethanolu.
 10. Přidáme 300 µl Plant DNAzol-ethanol mixu k vysrážené DNA, zvortexujeme a inkubujeme 5 min.
 11. Centrifugujeme 8 000 ot/min, 4 minut.
 12. Odsavujeme DNAzol-ethanol mix.
 13. Přidáme 300 µl 96 % ethanolu a promícháme
 14. Centrifugujeme 8 000 ot/min, 4 minut
 15. Odsavujeme ethanol a DNA pelet rozpustíme v 70 µl TE pufru. Jestliže jde pelet hůře centrifugujeme při 12 000 ot/min po dobu 4 minut a pelet rozpustíme v 8mM NaOH místo TE pufru.
- Lze získat koncentrace DNA 0.1 – 0.3 µg/µl.

PCR reakce:

Připraví se reakční mix (1 reakce = 25µl), který obsahuje sterilní vodu (9-13µl), 10 x pufr (2.5µl), směs oligonukleotidů dNTPs (0.5µl; koncentrace každého 0.2mM), forward primeru 1.25µl a reverse primeru 1.25µl (výsledná koncentrace každého primeru 0.5µM), 2-8µl templátové DNA. Do každé reakce se přidá nakonec 0.5µl Taq-polymeráza (výsledná koncentrace 1U).

Komponenty PCR:

- ❖ Sterilní voda
- ❖ Reakční pufr (10 x PCR buffer, dodává se s Taq DNA polymerázou)
- ❖ Směs nukleotidů dNTPs (dATP + dCTP + dGTP + dTTP)
- ❖ Primery I a II (FORWARD a REVERSE)
- ❖ Taq DNA polymeráza (termostabilní)
- ❖ Templátová DNA

Reakční pufr:

Jsou dva druhy: 10 x PCR buffer s 1.5mM $MgCl_2$
 10 x Mg^{2+} free buffer bez hořčíku + 50mM $MgCl_2$ -solution

10 x PCR buffer s 1.5mM $MgCl_2$ se do 25 μ l reakčního mixu dává 2.5 μ l

Konečná koncentrace $MgCl_2$ v 25 μ l reakčního mixu, mM	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0	2.5	3.0	4.0
Objem 50mM $MgCl_2$, μ l	0.5	0.625	0.75	0.875	1.0	1.25	1.5	2.0
10 x Mg^{2+} free buffer	1.0	1.875	1.75	1.625	1.5	1.25	1.0	0.5

Směs nukleotidů dNTPs:

50 x dNTP Master Mix 12.5 mM do 25 μ l reakčního mixu se dává 0.4 μ l

Nukleotidy jednotlivě 100 mM dATP; 100 mM dCTP; 100 mM dGTP; 100 mM dTTP

Z nich se připraví směs 10mM dNTPs mix:

360 μ l sterilní vody + 10 μ l 100 mM dATP + 10 μ l 100 mM dCTP + 10 μ l 100 mM dGTP + 10 μ l 100 mM dTTP.

Uchovat při -20°C. Do 25 μ l reakčního mixu se dává 0.5 μ l

Primery I a II (FORWARD a REVERSE)

Koncentrace zásobního primeru je 100 μ M.

Před použitím do reakce zředit 1:10 na 10 μ M (Příklad 1 μ l 100 μ M primeru + 9 μ l sterilní vody).

Konečná koncentrace primeru I v 25 μ l reakčního mixu, μ M	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0
Objem 10 μ M primeru, μ l	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	2.5

Konečná koncentrace primeru II v 25 μ l reakčního mixu, μ M	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0
Objem 10 μ M primeru, μ l	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	2.5

Taq DNA polymeráza (termostabilní)

0.5 μ l (1U) na vzorek Taq DNA polymerázy koncentrace 2U/ μ l

Templátová DNA:

Podle koncentrace DNA od 1 – 20 μ l. Obvykle dáváme 4 μ l.

Tipy a triky:

- ❖ Izolovaná DNA může obsahovat RNA. Můžeme přidat RNázu do Plant DNAzol (100 μ g RNázy/ml Plant DNAzol).
- ❖ Reakční směs připravujeme a pracujeme s ní vždy v chlazených zkumavkách (chladicí stojánek, ledová tříšť). S Taq polymerázou manipulujeme jen po nezbytnou dobu, vždy ji chladíme a ihned ukládáme do mrazicího boxu (-20°C).

Práce byla podporována grantem grantové agentury ČR číslo projektu 521/00/P050.

Identifikace chromozómů banánovníku metodou BAC FISH

OLENA ALKHILOVA, JAN ŠAFÁŘ, MARIE DOLEŽELOVÁ, EVA HŘIBOVÁ, JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 77200 Olomouc
Tel.: 585 228 521, e-mail: dolezel@ueb.cas.cz

Chromozómy banánovníku (*Musa acuminata*, $2n = 2x = 22$) jsou velmi malé (1 – 3 μm) a není možné je odlišit na základě velikosti či poměru délky ramen. V dřívější práci jsme izolovali a charakterizovali řadu repetitivních sekvencí DNA, včetně klonů nesoucích části genů pro 5S a 45S ribozomální RNA (Valárik *et al.* 2002). Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se značenou DNA těchto klonů umožnila identifikaci jednoho páru chromozómů nesoucího 45S rDNA a čtyř párů chromozómů nesoucích 5S rDNA. Ostatní sekvence byly buď rozptýlené v genomu nebo se vyskytovaly v oblasti centromér a neumožňovaly identifikaci dalších chromozómů. Cílem této práce bylo ověřit možnosti využití DNA klonů vybraných z BAC („bacterial artificial chromosome“) knihovny banánovníku k identifikaci chromozómů. Na základě hybridizace se značenou genomickou DNA byly z knihovny vybrány BAC klonů s malým obsahem repetitivní DNA a jejich značené inzerty byly použity pro FISH. I přes původní selekci se klonů lišily obsahem repetitivní DNA. FISH s první skupinou klonů dávala shluky signálů na více místech genomu, což naznačovalo přítomnost tandemově se opakujících sekvencí. Hybridizační signály druhé skupiny BAC klonů pokrývaly celé chromozómy s přednostní lokalizací v oblasti centromér. FISH s třetí skupinou BAC klonů vedla ke značení chromozómů po celé délce s výjimkou oblastí centromér a oblastí organizátoru jadérka. Zjistili jsme, že u prvních dvou skupin BAC klonů je možné hybridizaci repetitivních sekvencí blokovat pomocí C_{0t} -1 frakce izolované z genomické DNA *M. acuminata*. To umožnilo lokalizovat BAC klonů na konkrétní chromozómy. V současné době je možné pomocí FISH s vybranými BAC klonů a rDNA identifikovat šest z jedenácti chromozómů *M. acuminata*. Získané výsledky ukazují, že BAC FISH je metoda vhodná pro identifikaci chromozómů banánovníku. Chromozómově specifické sondy umožní studium strukturních změn chromozómů v průběhu evoluce a speciace rodu *Musa*.

Valárik M., Šimková H., Hřibová E., Šafář J., Doleželová M., Doležel J.: 2002 - Chrom. Res. 10: 89-100.

Podporováno granty AV ČR reg. č. A6038204 a Mezinárodní agentury pro atomovou energii reg. č. 12230/RBF.

P5

Strukturní vlastnosti DNA studované pomocí cirkulárního dichroismu

IVA KEJNOVSKÁ

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel.: 541 517 123, e-mail: kejnovska@ibp*Viz Biologické listy*, 2003, 68 (3): 189

P6

Nové metody fyzikálního mapování genomů rostlin

EDUARD KEJNOVSKÝ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel.: 541 517 194, e-mail: kejnovsk@ibp*Viz Biologické listy*, 2003, 68 (3): 192

Sestavování komplexu fotosystému II v sinici *Synechocystis* PCC 6803 s chybějícími strukturními podjednotkami

JOSEF KOMENDA^{1,2}, VERONIKA REISINGER³, LUTZ A. EICHACKER³

¹ MBÚ AVČR, Opatovický mlýn 37981 Třeboň, ČR; ² Ústav fyzikální biologie, Jihočeská univerzita, Zámek 136, 37333 Nové Hradky, ČR; ³ Botanisches Institut der Ludwig-Maximilians Universität München, Menzinger Str. 67, 80368 München, Německo, tel.: 384721101, e-mail: komenda@alga.cz

Studovali jsme biogenezi komplexu fotosystému II (PSII) v sérii mutantů sinice *Synechocystis* PCC 6803. Po odstranění genů *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD* a *psbEFLJ* kódující proteiny D1, CP47, CP43, D2 a podjednotky α i β cytochromu b-559 jsme sledovali sestavování komplexů PSII pomocí radioaktivního značení ³⁵S methioninem a imunodetekcí po dvojrozměrné separaci komplexů metodou BN-/SDS-PAGE. V thylakoidních membránách divokého kmene jsme detekovali monomerní a dimerní komplexy jádra PSII i menší subkomplexy. Naproti tomu v mutantních kmenech jsme našli pouze specifické menší subkomplexy, ale nikoliv monomer a dimer jádra. V kmeni Δ psbC bez CP43 jsme zjistili komplex obsahující veškeré podjednotky kromě CP43, což ukázalo, že tento chlorofyl-protein se připojuje k ostatním jako poslední. V kmeni Δ psbB s chybějícím CP47 značené proteiny D1 a D2 vytvářely dva komplexy reakčního centra (RCII), zatímco CP43 zůstávalo volné. Tento výsledek ukázal, že připojení CP47 k RCII předchází vazbě CP43 do komplexu. V nepřítomnosti D1 se CP43, CP47, D2 i cytochrom b-559 akumulovaly v membráně, ale nevytvářely žádné vysokomolekulární komplexy. To znamená, že pro vazbu CP47 i CP43 je nezbytná existence komplexu RCII obsahujícího D1, D2 a cytochrom b-559. V mutantu bez proteinů D2 a CP43 jsme zjistili syntézu D1 i CP47, ale pouze CP47 a cytochrom b-559 se akumulovaly do imunodetekovatelné úrovně. Tento výsledek ukázal, že bílkoviny D1 a D2 jsou syntetizovány nezávisle, ale pro akumulaci D1 je nezbytná přítomnost D2. Konečně, pokud chyběly podjednotky cytochromu b-559, CP43 i CP47 se akumulovaly, D1 byl pouze syntetizován, ale neakumuloval se, a protein D2 nebyl vůbec syntetizován. Získaná data naznačila, že přítomnost cytochromu b-559 v membráně a na něm závislá akumulace D2 jsou nezbytné počáteční kroky při sestavování komplexu PSII.

Podporováno granty LN00A141, MSM 12300001 a AV0Z5020903

Studium alternativních rostlinných telomer

ZUZANA KUNICKÁ

Laboratoř analýzy biologicky významných molekulových komplexů, Masarykova Univerzita v Brně, Královopolská 135,
612 65 Brno

Tel.: 541 517 151, e-mail: kunicka@ibp.cz

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 203

Třídění ramen chromozómů pšenice tvrdky pomocí průtokové cytometrie

MARIE KUBALÁKOVÁ, JAN BARTOŠ, PAVLÍNA KOVÁŘOVÁ, JARMILA ČÍHALÍKOVÁ, JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 77200 Olomouc

Tel.: 585 228 521, e-mail: dolezel@ueb.cas.cz

Analýza jaderného genomu pšenice tvrdky (*Triticum durum*, $2n = 4x = 48$) je obtížná kvůli jeho velikosti ($1C \approx 12000$ Mbp) a tetraploidii. Mapování a klonování genů by mohlo být podstatně zjednodušeno rozdělením genomu na definované části, např. chromozómy či jejich ramena. Cílem této práce bylo vyvinout metodu přípravy suspenze mitotických chromozómů a ověřit možnosti jejich třídění pomocí průtokové cytometrie. Suspenze intaktních chromozómů byla připravena homogenizací synchronizovaných buněk kořenových meristémů fixovaných ve formaldehydu. Izolované chromozómy byly barveny fluorescenčním barvivem DAPI a intenzita fluorescence byla analyzována průtokovou cytometrií. Na histogramu relativní intenzity fluorescence („flow karyotypu“) byly rozlišeny dva píky. Menší pík byl tvořen chromozómy 1A, 4A a 6A, zbývajících jedenáct chromozómů bylo zahrnuto v hlavním píku. Zjištění, že není možné třídit ani jeden ze 14 typů chromozómů, stimulovalo analýzu ditelosomických linií, které obsahují vždy jeden chromozóm ve formě dvou telozómů (oddělené krátké a dlouhé rameno). Protože jsou telozómy kratší než ostatní chromozómy, bylo je možné diskriminovat a třídit. Chromozómy tříděné na mikroskopické sklíčko byly identifikovány pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se sondami pro mikrosatelit GAA a pro repetitivní sekvence pSc119 a *Afa*. Genomická distribuce těchto sekvencí byla u pšenice tvrdky stanovena poprvé a podobala se distribuci v A a B genomech pšenice obecné. Tříděné telozómy (ramena chromozómů) byly použity k fyzickému mapování molekulárních markerů na subchromozomální úrovni pomocí PCR se specifickými primery. Výsledky získané v této práci umožní urychlit fyzické mapování genomu pomocí FISH a PCR a konstrukci knihoven DNA specifických pro jednotlivá ramena chromozómů pšenice tvrdky.

Podporováno granty MŠMT reg. č. ME527 a ME528.

Efektivní přístup k hodnocení DNA markerů

LADISLAV KUČERA¹, KATEŘINA POLÁKOVÁ¹, LEONA LEIŠOVÁ¹, JAROSLAVA OVESNÁ¹

¹ VÚRV, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně, ČR

Tel.: 233022247, e-mail: kuceral@vurv.cz

Jedinečné vlastnosti DNA markerů jsou důvodem jejich rychlému rozšíření a jejich použití závisí na účelu a cílech studií. Kromě případů identifikace přítomnosti určitých genů (případně určitých alel), nebo přítomnosti markerů specifických pro některého z rodičů u studovaných subjektů, je časté jejich využití pro stanovení míry genetického polymorfismu a při studiu genetické diversity populací nebo souborů genových zdrojů. Důležitým krokem při výběru vhodných molekulárních markerů je stanovení jejich schopnosti postihnout míru genetické rozmanitosti v analyzovaném souboru. Interpretační možnosti jsou výrazně ovlivněny použitím různých postupů stanovení genetické proměnlivosti. Významným faktorem pro výběr vhodného markeru, je i jeho spolehlivost, která souvisí se vzorkovací chybou odvislou od studovaného genomu a použité markerovací techniky.

Na vybraných příkladech (pšenice, ječmen) je dokumentován postup výběru vhodných párových koeficientů pro binární data odvozená z AFLP a SSR analýz a postup optimalizace výběru markerů (Kučera et al. 2003).

Kučera Ladislav, Poláková Kateřina, Leišová Leona, Ovesná Jaroslava: Assessing the utility of SSR and AFLP markers for measures of genetic proximity in barley and wheat collections. In: Integrated quantitative and molecular genetics in plant breeding. Book of Abstr. 12th meeting of the EUCARPIA section of biometrics in plant breeding. September, 3-5, 2003, A Coruna, 40

Studium interakcí nukleových kyselin s proteiny pomocí piezoelektrického biosensoru

KATEŘINA KUCHARÍKOVÁ, HANA PIVOŇKOVÁ, MIROSLAV FOJTA

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 197, e-mail: katka@ibp.cz)

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 200

Detekce houbových patogenů v pletivech hostitelských rostlin pomocí PCR

LEONA LEIŠOVÁ¹, VĚRA MINAŘIKOVÁ², JAROSLAVA OVESNÁ¹

¹VÚRV, Drnovská 507, 161 00 Praha 6 – Ruzyně, ČR

²ZVU, Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, ČR

Tel.: +420 233 022 425; e-mail: leišova@vurv.cz

Houbové patogeny patří mezi nejrozšířenější rostlinné patogeny vůbec. Způsobují značné ekonomické ztráty a proto se jejich studiu věnuje stále větší pozornost. Základem pro studium působení patogena v rostlině je jeho (1) detekce a (2) stanovení obsahu v pletivech rostliny.

(1) K tomuto účelu se využívá metody polymerázové řetězové reakce, kde primer hraje roli specifického markeru. Testuje se pak přítomnost či nepřítomnost amplifikovaného produktu, jeho délková či sekvenční variabilita.

(2) Pro kvantitativní stanovení obsahu houbového patogena v pletivech hostitele se dnes využívá řady metod. Taq Man Real-Time PCR je metodou založenou na polymerázové řetězové reakci, kde do reakce vstupuje kromě páru primerů ještě tzv. Taq Man sonda – oligonukleotid hybridizující do oblasti mezi primery. Je značen na 5'konci fluorescenční značkou a na 3'konci je kovalentně navázán zlášeč fluorescence. 5'3' exonukleázová aktivita Taq polymerázy v elongačních fázích PCR způsobuje degradaci sondy a to vede ke vzrůstu fluorescence, která je v každém cyklu PCR reakce detekována.

Oba přístupy, jak jednoduchá detekce patogena, tak jeho kvantitativní stanovení se neobejdou bez použití specifického markeru. Pro studium geonotu hub se molekulární markery nejčastěji odvozují z RAPD nebo z analýzy ITS oblasti. Tam, kde žádná z těchto metod neposkytuje vhodné výsledky, je třeba zvolit jiné postupy, které však bývají pracnější a časově náročnější.

Houbové patogeny rodu *Pyrenophora* parazitují na různých druzích trav (Ondřej 2000). Ze zemědělského hlediska jsou nejdůležitější druhy *P. tritici repentis*, jejímž hostitelem je pšenice (*Triticum aestivum*) a *P. graminea* a *P. teres*, které způsobují hnědé skvrnitosti na listech ječmene (*Hordeum vulgare*). *P. teres* se vyskytuje ve dvou formách: *P. teres* f.sp. *teres* a *P. teres* f.sp. *maculata*, které se liší charakterem symptomů na listech (Smedegaard-Petersen, 1977).

Cílem této práce bylo pokusit se nalézt druhově specifický marker pro kvalitativní detekci a pro kvantitativní stanovení houby *Pyrenophora teres* v hostiteli metodou Taq Man Real-Time PCR.

Ani aplikace SCAR markerů (Doohan et al. 1999) ani analýza ITS oblastí (Stevens et al. 1998) neposkytly uspokojivé výsledky pro získání specifického markeru. Vytvoření knihovny restričních fragmentů je příliš časově i finančně náročné a proto byla jako výchozí zvolena metoda AFLP (Vos et al. 1995). Základem metody je aplikace restričních endonukleáz EcoRI a MseI na genomovou DNA patogena a provedení výběru restričních fragmentů tzv. selektivní amplifikací. Analýzou výsledků amplifikace metodou kapilární elektroforézy byly vytrženy fragmenty specifické vždy pro jeden druh rodu *Pyrenophora*. Fragmenty reprezentované nejvýraznějšími signály byly zaklonovány do pPCR-Script Amp SK+ phagemidu (Stratagene) a sekvencovány. Na základě získaných sekvencí byly navrženy specifické primery a Taq Man sondy pro testy přítomnosti patogena a pro jeho kvantitativní stanovení v pletivech hostitelské rostliny pomocí PCR.

Navržený marker DTT471h detekuje přítomnost *P. teres* f.sp. *teres*, amplifikační produkt má délku 91bp. *P. teres* f.sp. *maculata* je detekována pomocí navrženého markeru DTM494d, amplifikační produkt o délce 160bp. Obě formy *P. teres* jsou detekovány markerem DT376b (amplifikační produkt o délce 91bp). Tento marker spolu s odpovídající Taq Man sondou DT376bS se ukázal jako vhodný pro stanovení obsahu *P. teres* v listových pletivech hostitele metodou Real Time PCR.

Metoda AFLP se ukázala jako vhodná výchozí metoda k získání specifických markerů, zejména u těch druhů organismů, o jejichž genomu toho není příliš mnoho známo. Nevýhodou je časově náročné postupné vyselektovávání zvoleného klonu ze směsi klonů o různých, ale velmi blízkých délkách. Naopak výhodou je snadnost získání předběžných dat a možnost rychlého výběru fragmentů DNA vhodných k získání specifických markerů.

Doohan F.M., Parry D.W., Jenkinson P., Nicholson P.: 1998 - Plant Pathol. 47: 197-205.

Ondřej M.: 2000 - Agro 9: 8-10.

Smedegaard-Petersen V.: 1977 - Phytopath. Z. 89: 193-202.

Stevens E.A., Blakemore E.J.A., Reeves J.C.: 1998 - Mol. Plant Pathol., on-line.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Horners M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuijper M., Zabeau M.: 1995 - Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.

Podporováno projektem NAZV ČR - QC1361.

Využití metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) ke studiu struktury a evoluce rostlinných genomů

MARTINA LENEROVÁ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel.: 541 517 203, e-mail: lengerova@ibp.cz

Silene latifolia Poiret (knotovka bílá) je modelem ke studiu evoluce pohlavních chromozómů u rostlin. Karyotyp samičích rostlin se skládá z 11 párů autozómů a dvou submetacentrických chromozómů X. Karyotyp samčích rostlin je tvořen 11 páry autozómů, chromozómem X a Y. Jedním z nástrojů studia struktury pohlavních chromozómů je fyzikální lokalizace jedinečných sekvencí metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Protože je u rostlin obtížné touto metodou dostatečně citlivě detekovat jedinečné sekvence kratší než 10 kb, použili jsme jako zdroj nových sond částečnou knihovnu bakteriálních umělých chromozómů (BAC), která se vyznačuje velmi dlouhými inzerty. Vyseletovali jsme několik klonů, které hybridizují přednostně na pohlavních chromozómech nebo dávají signály na jednom páru autozómů. Na základě již dříve charakterizovaných sekvencí a nově získaných BACových klonů jsme sestavili FISH-karyotyp zmíněného druhu, ve kterém lze na základě přítomnosti a intenzity fluorescenčních signálů rozlišit všechny páry autozómů. Byla také zmapována vzájemná poloha několika klonů na pohlavních chromozómech. Osvědčila se nám zejména metoda vícebarevné FISH, při které jsme chromozómy postupně hybridizovali až se čtyřmi různě značenými sondami.

Tyto poznatky jsou důležité zejména teď, kdy jsou na pohlavních chromozómech *S. latifolia* mapovány nové geny a na základě jejich polohy a pořadí vyvozovány závěry ohledně struktury a evoluce chromozómů X a Y.

Tato práce je finančně podporována Grantovou agenturou ČR (grant 521/02/0427).

Použití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF pro identifikaci rostlinné fosfolipasy D a studium jejích posttranslačních modifikací

JAN LINEK¹, ZUZANA NOVOTNÁ¹, RADOVAN HYNEK¹, OLGA VALENTOVÁ¹, MARTIN POTOCKÝ¹, JAN MARTINEC²

¹ VŠCHT PRAHA, Technická 5, 16610 Praha 6 - Dejvice, ČR; ² ÚEB AVČR, Rozvojová 135, 165 02, Praha 6, ČR

Tel.: 224353017, e-mail: linekj@vscht.cz

Membránové fosfolipidy jsou již díky své poloze předurčovány ke zprostředkování přenosu signálu a vskutku některé signalizační kaskády jsou spouštěny aktivací enzymů štěpících tyto fosfolipidy za vzniku sekundárních posílů (DAG, PA, LPA, IP₃). Jedním z těchto enzymů je i fosfolipasa D (PLD) hydrolyzující fosfolipidy na kyselinu fosfatidovou (PA), která následně přímo i nepřímo ovlivňuje aktivitu řady enzymů [1]. U rostlin je mechanismus regulace tohoto enzymu na molekulové úrovni málo prozkoumán.

Podařilo se nám poprvé u rostlin *Brassica oleracea*, var. *capitata* pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF identifikovat formu PLD homologní s AtPLD γ 2 a analýzou tryptických hydrolyzátů nalézt 5 možných fosforylačních míst. Imunochemicky se podařilo identifikovat proteiny fosforylované na serinu, threoninu a tyrosinu s elektroforetickou pohyblivostí shodnou s formou PIP₂ dependentní PLD a molekulovou hmotností odpovídající PLD. Dále byl pozorován inhibiční vliv fosfatasy na PIP₂ dependentní aktivitu PLD *in vitro* a výsledky tedy ukazují na význam fosforylace PLD pro regulaci aktivity tohoto enzymu [2].

[1] Munnik, T.: 2001 - Trends Plant Sci. 6, 227-233

[2] Novotná Z., Linek J., Hynek R., Martinec J., Potocký M., Valentová O.: 2003 – FEBS Letters 27728, 1-5 (v tisku)

Podporováno grantem LN00AO81 - MŠMT ČR

Cytogenetická analýza mezidruhového hybridu *Silene latifolia* x *viscosa*

MICHAELA MARKOVÁ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno, 612 65

Tel.: 541 517 203, email: m.markova@email.cz

Mezidruhový hybrid *S. latifolia* x *viscosa* byl připraven opylením květů *S. latifolia* (ekotyp Brno) pylem *S. viscosa* (ekotyp Rohatec). Infikováním explantátů bakterií *Agrobacterium rhizogenes* jsem získala kultury hairy-roots, které jsem využila jako zdroj metafázních chromozómů. Ze synchronizovaných buněk v kořenových špičkách jsem izolovala protoplasty pomocí celulolytických enzymů. Připravené protoplasty jsem fixovala ve Farmerově fixáži a kapala na skla. Preparáty jsem barvila Giemsovým barvivem a používala pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH). *In situ* hybridizace s celkovou genomickou DNA obou druhů (GISH) prokázala, že v hybridovi jsou oba genomy přítomny, během buněčného cyklu separovány a lze je jednoznačně rozlišit.

Dalším krokem analýzy bylo studium případné inaktivace jednoho z rodičovských genomů. Transkripčně aktivní chromatin je spojen zejména s modifikacemi histonů. Prováděla jsem tedy imunofluorescenční analýzu s použitím polyklonální protilátky proti acetylovanému lyzinu v pozici 5 histonu H4. Z mladých listů hybridu jsem mechanicky izolovala interfázni jádra a suspenzi nanasla na skla metodou cytocentrifugace ve formaldehydové fixáži. Preparáty jsem dále uchovávala v 50% glycerolu v ledničce a používala pro imunocytochemické reakce se specifickou protilátkou. Skla jsem analyzovala pod fluorescenčním mikroskopem a zaznamenávala pozice jader. Na stejných preparátech jsem následně prováděla GISH a sledovala korelaci protilátkového signálu a organizace obou genomů v interfázních jádrech.

Výsledky naznačují, že oba genomy jsou transkripčně aktivní a tedy ani jeden z nich není v hybridovi umlčován. Součástí dalšího výzkumu je analýza aktivity parentálních alel v hybridním genomu metodou RT-PCR.

Tato práce je finančně podporována Grantovou agenturou ČR (grant 522/02/1485)

Identifikace odrůd révy vinné pomocí molekulárně-genetické metody RAPD

KATEŘINA MORAVCOVÁ, MIROSLAV BARÁNEK, MIROSLAV PIDRA

Zahradnická fakulta MZLU, Valtická 433, Lednice 691 44

Tel: 519 367 313, fax: 519 367 202, e-mail: xmoravc2@node.mendelu.cz

Odrůdy révy vinné registrované v České republice byly předmětem RAPD analýzy. DNA byla izolována z mladých listů pomocí komerčního kitu firmy Qiagen. Pro screening metody RAPD bylo použito sto dvacet primerů a devět odrůd s předpokladem jejich genetické odlišnosti. Šestnáct primerů produkujících opakovatelné a polymorfní bandy bylo použito pro RAPD amplifikaci u všech odrůd registrovaných v České republice. Ze získaných výsledků byl vytvořen dendrogram příbuznosti odrůd a byl sestaven klíč pro identifikaci odrůd. Z padesáti jedné odrůdy se podařilo jednoznačně – pomocí přítomných bandů- identifikovat dvacet šest. Devět odrůd bylo možné určit pouze pomocí přítomných i nepřítomných bandů. Některé velmi úzce příbuzné odrůdy vytvořily malé skupinky, které bylo možné identifikovat pouze jako celek a dvě odrůdy se nepodařilo identifikovat vůbec. Všechny odrůdy budou rovněž testovány přesnější metodou SSR. Výsledky obou metod budou srovnány a bude vytvořena metodika identifikace každé dané odrůdy. Cílem práce je vytvoření katalogu typických RAPD a SSR produktů odrůd registrovaných v České republice.

Studium NADP-malátdehydrogenasy (dekarboxylační) v rostlinách tabáku infikovaných viry bramboru

KAREL MÜLLER¹, VERONIKA DOUBNEROVÁ¹, HELENA RYŠLAVÁ¹, NOEMI ČEŘOVSKÁ²

¹ Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, Praha 2, 128 40

² Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00

Tel.: 221951282, e-mail: rysl@natur.cuni.cz

NADP-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační), NADP-ME (EC 1.1.1.40) katalyzuje přeměnu malátu, popř. oxaloacetátu na pyruvát a CO₂ za současné tvorby NADPH. Dobře prozkoumán je především u rostlin s C₄ typem metabolismu, kde poskytuje substrát pro ribulosabifosfátkarboxylasu-oxidasu. Jeho funkce v C₃ rostlinách není přesně známa, může se podílet na udržení stálého pH v buňce nebo sloužit k syntéze redukčních ekvivalentů NADPH.

V této práci jsme sledovali vliv biotického stresu na aktivitu NADP-ME v listech tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1). Biotický stres byl způsoben infekcí viry bramboru Y (PVY) a to dvěma členy této skupiny - PVY^O a PVY^{NTN}, které se liší v projevech. Infekce virem PVY^{NTN} má znatelnější příznaky a často dochází k uhynutí celé rostliny. Relativní obsah virů byl analyzován metodou DAS-ELISA s použitím polyklonálních nebo monoklonálních protilátek.

Bylo zjištěno, že aktivita NADP-ME stoupá v závislosti na době infekce, závisí i na typu použitého viru. Maximální nárůst byl v případě PVY^{NTN} infekce 500%.

V částečně purifikovaném preparátu NADP-ME byly studovány kinetické vlastnosti tohoto enzymu. Bylo stanoveno pH optimum, Michaelisovy konstanty pro malát a NADP, enzym je inhibován nadbytkem substrátu (malát), nukleotid NADP nemůže být nahrazen NAD. Byl nalezen rozdíl v koncentracích některých nízkomolekulárních metabolitů (malát, glukosa, glukosa-6-fosfát, fruktosa-6-fosfát) v kontrolních a infikovaných listech tabáku. Je diskutován vliv těchto metabolitů na aktivitu enzymu.

Ryšlavá H., Müller K., Semorádová Š., Synková H., Čeřovská N.: 2003 – Photosynthetica 41, v tisku

Čeřovská N.: 1998 – Plant. Pathol. 47: 505-509

Podporováno granty GAČR 206/01/1061, GAUK 134/2001/B-BIO/PrF a MŠMT 1131 00001

Sledování interakcí DNA s proteiny pomocí elektroforézy v agarosových gelech s následným *western* přenosem a imunodetekcí

HANA PIVOŇKOVÁ, KATEŘINA NĚMCOVÁ, MIROSLAV FOJTA

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel.: 541 517 197, e-mail: hapi@ibp.cz

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 234

Využití real-time PCR pro hodnocení genové exprese u ječmene

JAROSLAVA OVESNÁ, PETRA WILDOVÁ, LADISLAV KUČERA, JIŘÍ ZÁMEČNÍK

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Změny v expresi genů zajišťují obvykle reakci živých organismů na výskyt stresorů v prostředí. Výjimkou nejsou ani rostliny. Byla popsána řada proteinů, které se vyskytují po působení chladu, sucha či po napadení organismu patogenem.

Technologický rozvoj nabízí stále více nástrojů pro studium výše uvedených změn. Kromě postupů využívaných již delší dobu jako je Northern blotting a RT – PCR využívající reverzní transkriptase byla řada možností doplněna o DNA pole (DNA chips/DNA arrays) a PCR v reálném čase (Real-Time PCR). Obě posledně jmenované techniky umožňují porovnávat expresi genů za odlišných podmínek. Zatímco DNA pole umožňují s nižší přesností odečítat expresi až tisíců genů v jedné reakci, real-time PCR je přesnější, avšak počty sledovaných genů ve srovnatelném čase jsou výrazně nižší.

Posuzovali jsme možnost využití PCR v reálném čase pro hodnocení exprese genů u ječmene na modelu chladového stresu a genů kódující dehydriny (*Dhn*). Pro analýzu jsme využili fluorescenční barvivo SYBRGreen a zařízení ABI PRISM 7700. Jako interní gen se stabilní exprese byl zvolen ubiquitin. Účinnost PCR pro amplifikaci 362bp dlouhého produktu dosahovala 1.9 a nebyla ovlivněna výchozí koncentrací templátu. Byla hodnocena exprese sedmi odlišných dehydrinů. U jednoho z dehydrinů bylo dosaženo maximální míry amplifikace 1,7 avšak ani v tomto případě neměla koncentrace templátu vliv.

Expres byla hodnocena metodou kalibrační křivky. Zjistili jsme, že po působení chladového stresu není zcela stabilní ani exprese ubiquitinu, proto budou testovány další house-keeping geny. Expres ubiquitinu však není zvýšena v takové míře jako dehydrinových genů. Nejvýrazněji se zvýšila po působení chladového stresu exprese *Dhn5* a *Dhn8*.

Lze konstatovat, že real-time PCR a SYBRGreen lze využít pro hodnocení exprese genů u ječmene.

Hahnen S., Joeris T., Kreuzaler F., Peterhansel C.: 2003- Photosynt. Res. 75: 183-192

Mir K.U., Southern E.M.: 2000 – Ann. Rev. Genom. Genet. 1: 329 - 360

Zhu B., Choi D.W., Fenton R., Close T.J.: 2000- Mol. Gen. Genet. 264: 145-153

Podporováno projektem Mze - NAZV QC 1336

Charakterizace genových zdrojů rostlin: AFLP, SSR, SSCP a SNaPshot

JAROSLAVA OVESNÁ, KATEŘINA POLÁKOVÁ, LADISLAV KUČERA, LEONA LEIŠOVÁ

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Prague 6 – Ruzyně

Genové zdroje jsou cenným dědictvím lidstva. Genové zdroje jsou sbírány, charakterizovány a uchovávány. Charakterizace genových zdrojů rostlin probíhá nejčastěji v polních testech. Takové testy jsou časově náročné a vyžadují víceleté opakování.

Metody založené na hodnocení polymorfismu DNA jsou rychlé, spolehlivé a nezávislé na prostředí. Využili jsme metody AFLP, délkové variability mikrosatelitních lokusů a SNaPshot pro hodnocení variability genových zdrojů pšenice a ječmene. Pro hodnocení genových zdrojů ječmene zahrnujících 82 položek jarního sladovnického ječmene používaných v minulém století na území ČR. Nejstarší registrovaná položka pocházela z r. 1886 (Proskowetz Hana Pedigree). Shluková analýza založená na výskytu polymorfních lokusů AFLP a SSR naznačuje, že uvedené markerovací systémy hodnotí odlišná místa chromozómů. Na základě výsledků je možné konstatovat, že šlechtění na sladovnickou kvalitu posunulo genetický základ českých sladovnických ječmenů. Zejména genetický základ odrůd povolených v 90. letech minulého století byl užší ve srovnání se strašními odrůdami. U ječmene jsme na modelu *Mlo* lokusu prokázali možnost využití SSCP a SNaPshot markéru a přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyser pro genotypizaci rostlin. Obdobně byly charakterizovány genové zdroje ozimé pšenice zahrnující krajové i moderní odrůdy (celkem 162 odrůd). Výsledky byly obdobné. Neprokázal se však významný vliv pšenic využívaných ve šlechtění v 60. letech. Metodu AFLP jsme úspěšně aplikovali i na další rostlinné druhy (kaštan, bambus).

Metody jsou vhodné pro identifikaci genových zdrojů ale i odrůd kulturních druhů. Jsou využívány pro efektivní práci genové banky.

Gupta P.K., Roy J.K., Prasad M.: 2001- Curr. Sci. 80: 524-535

Christiansen M.J., Andersen S.B., Ortiz R.: 2002 - Mol. Breed. 9: 1-11

Ovesná J., Poláková K., Leišová L.: 2002 - Czech J. Genet. Plant Breed. 38: 29-40

Prasad M., Varshney R.K., Roy J.K., Balyan H.S., Gupta P.K.: 2000 - Theor. Appl. Genet. 100: 584-592

Reddy M.P., Sarla N., Siddiq E.A.: 2002 - Euphytica. 128: 9-17

Tagu D.: 1999 - Techniques of molecular biology. INRA Editions; Versailles; France, pp.131

Podporováno projektem NAZV QC 1336

P21

Porovnání metod izolace RNA pro detekci latentního viroidu chmele (HLVd) pomocí *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR u chmele (*Humulus lupulus*)

JOZEF PATZAK

Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

Tel.: 415 732 109, Fax: 415 732 150, e-mail: j.patzak@telecom*Viz Biologické listy*, 2003, 68 (3): 219

P22

Stanovení aktivit rostlinných fosfolipas *in situ* s využitím fluorescenčně značených substrátůPŘEMYSL PEJCHAR^{1,2}, OLGA VALENTOVÁ¹, JAN MARTINEC²¹ Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6-Dejvice² Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6-LysolajeTel.: 296 780 420, e-mail: pejchar@ueb.cas.cz*Viz Biologické listy*, 2003, 68 (3): 227

Alternativní postupy detekce jednobodových mutací v genomu ječmene

KATEŘINA POLÁKOVÁ¹, DAVID LAURIE²

¹VÚRV, Drnovská 507, 16106 Praha 6 - Ruzyně; ²JIC, Colney Lane, NR4 7UH Norwich, UK

Tel.: 233022330, e-mail: katerina.polakova@vurv.cz

Jednobodové mutace známé jako SNP (Single Nucleotide Polymorphism) představují velmi slibné molekulární markéry v genomech rostlin. Jednobázové polymorfismy jsou bohatým zdrojem genetické variability mezi individui v rámci druhu, odrůd a linií. SNP ležící v kódujících sekvencích genů často souvisejí se substitucí aminokyseliny v proteinu, což může vést k významné změně kvalitativních parametrů jedince nebo jeho náchylnosti k chorobám. Významné SNP markéry mohou být tak využity ve šlechtitelských programech pro výběr linií nesoucí vyžadované vlastnosti. Pro tyto účely je zapotřebí zvolit metodu detekce SNP pro rozsáhlé skrínování populací s ohledem na jednoduchost, nenáročnost a ekonomičnost technologie. Většina současně používaných metod SNP skrínování je založena na amplifikaci cílové DNA sekvence nesoucí jednobodovou mutaci s následnou analýzou resp. genotypizací. Představujeme zde dvě SNP skrínovací metody založené na analýze v prostředí agarózového gelu a s použitím dvou odlišných genetických analyzátorů. SNP markéry ležící v kódujících sekvencích genů ovlivňující kvalitativní parametry zrna ječmene byly skrínovány na souboru 80-ti odrůd ječmene odlišujících se v kvalitě zrna.

Detekční technika aplikovatelná ve všech laboratořích molekulární biologie se standardním vybavením využívá pozice SNP v sekvenci, která je rozpoznávána restrikční endonukleázou. SNP polymorfismus tak způsobuje u různých jedinců vznik nebo zánik restrikčního místa dané endonukleázy, což nám umožňuje určit typ SNP genotypu daného jedince dle štěpení nebo neštěpení PCR produktu. Další metoda nenáročná na speciální přístrojové vybavení laboratoře vyžaduje dva primerové páry generující během PCR reakce produkty, jejichž odlišné délky určují SNP genotyp. Metoda je známá jako tzv. Tetra-primer ARMS-PCR (Ye S. et al., 2001).

Velice efektními metodami pro rozsáhlé SNP skrínování jsou pyrosekvencování (PyrosequencingTM) a denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie (tzv. Wave systém, TransgenomicsTM) vyžadující speciální přístrojové vybavení. Pyrosekvencování je de facto sekvencování velmi krátkých úseků DNA (do 20 bp) v reálném čase. Metoda je náročná na fluorescenční chemii a enzymatický systém. Detekce SNP pomocí Wave systému je založená na separaci produktů vzniklých po počáteční denaturaci směsi PCR produktů neznámého vzorku s kontrolním vzorkem se známým SNP a následném ochlazení, při kterém vznikají dva homoduplexy a dva heteroduplexy v případě, že neznámý vzorek nese jinou bazi v SNP pozici než kontrolní vzorek. Obě dvě metody se ukázaly být velice přesné a účinné pro rozsáhlé SNP skrínování, ale každá nese výhody a nevýhody. Pro úspěšné pyrosekvencování je zapotřebí důsledné přečištění PCR produktu, PCR primery, včetně sekvenčního primeru, by měly být HPLC purifikovány, přičemž jeden PCR primer musí být biotinylován. Tyto modifikace primerů a požadavek speciálního enzymatického a fluorescenčního systému se výrazně odrážejí na ceně analýzy, která je vyšší oproti jiným technikám. Faktem je, že samotná SNP genotypizace 96 vzorků na pyrosekvenátoru trvá pouze 10 minut. Oproti tomu Wave systém nevyžaduje žádné primerové modifikace a přečišťování PCR produktů, ale analýza 96 vzorků trvá 3 hodiny.

V současné době je známa řada technik vhodných pro SNP skrínování. My jsme představili čtyři z nich, které se odlišují v náročnosti na vybavení laboratoří molekulární biologie, v náročnosti samotné přípravy analýzy a z ekonomického hlediska. Tyto parametry ovlivňují výběr metody pro SNP skrínování, ale ne všechny uvedené metody můžeme úspěšně použít pro různé typy SNP, protože to nedovoluje sekvence obklopující daný SNP.

Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A.R., Day N.M.: 2001 – Nuc. Ac. Res. 29: 88-96.

Podporováno projektem NAZV QD1365 a organizací Marie Curie Fellowship, kontrakt HPMT-CT-2000-00033.

Využití průtokové cytometrie pro stanovení velikosti jaderného genomu u zástupců rodu *Koeleria* (*Poaceae*)

PAVLA SUCHÁNKOVÁ¹, ALEŠ PEČINKA², JAROSLAV DOLEŽEL¹

¹ Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 77200 Olomouc

² Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany

Tel.: 585 228 521, e-mail: dolezel@ueb.cas.cz

Průtoková cytometrie byla použita k analýze velikosti jaderného genomu čtyř českých a slovenských druhů rodu *Koeleria* Pers. ($x = 7$) s cílem přispět k objasnění taxonomicko-fylogenetických vztahů mezi střeoevropskými zástupci této kritické skupiny trav. Suspenze intaktních jader byly připraveny homogenizací listových pletiv a jaderná DNA byla barvena pomocí propidium jodidu. Jako referenční standard sloužila jádra izolovaná z listových pletiv žita (*Secale cereale* L., cv. Daňkovské, $2C = 16,19$ pg DNA, Doležel *et al.* 1998). Velikost jaderného genomu *K. glauca* (Spreng.) DC. ($2n = 2x$) byla stanovena na $2C = 5,20$ pg DNA a *K. pyramidata* (Lam.) Beauv. ($2n = 10x$) na $2C = 22,89$ pg DNA. *K. macrantha* (Ledeb.) Schult. se ve střední Evropě vyskytuje jako diploidní var. *macrantha* a tetraploidní var. *majoriflora* nom. provis. Zjištěná velikost obsahu jaderné DNA byla $2C = 4,94$ pg u var. *Macrantha* a $2C = 9,31$ pg u var. *majoriflora*. Jihoslovenské populace var. *majoriflora* obsahovaly o 5,3% více jaderné DNA než populace z České republiky. Velikost jaderného genomu endemického druhu Západních Karpat *K. tristis* Domin ($2n = 12x$) byla $2C = 29,23$ pg DNA. Rostliny z izolované východoslovenské lokality (Branisko) měly o 8,8% větší jaderný genom než populace ze západního Slovenska. U všech taxonů kromě *K. macrantha* byla velikost jaderného genomu stanovena poprvé a pro zmíněný druh byly stávající údaje výrazně upřesněny. Velikost jaderného genomu polyploidních taxonů byla menší, než by odpovídalo násobkům velikosti genomu diploidních taxonů, a to pravděpodobně v důsledku nižšího obsahu repetitivních DNA sekvencí. Variabilita velikosti jaderného genomu korelovaná s geografickým rozšířením *K. macrantha* var. *majoriflora* a *K. tristis* naznačuje možnou dlouhodobou izolaci populací nebo jejich různou evoluční historii.

Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L., Obermayer, R.: 1998 - Ann. Bot. 82 (Suppl. A): 17-26

3D rekonstrukce anomálií v ultrastruktuře transgenního *ipt* tabáku

HELENA SYNKOVÁ¹, RENÁTA PECHOVÁ^{1,2}

¹ Ústav experimentální botaniky AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6

² Katedra anatomie a fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 43 Praha 2

Tel.: 233 320 338, e-mail: synkova@ueb.cas.cz

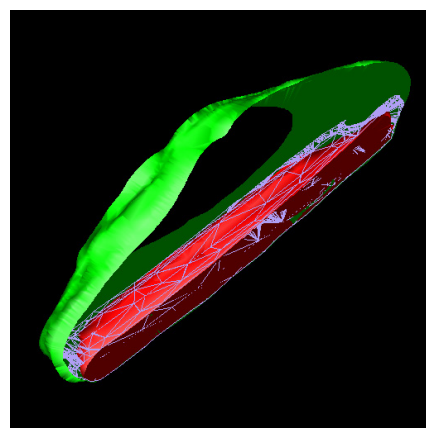
Elektron mikroskopické studium transgenního tabáku se zvýšeným obsahem endogenních cytokininů prokázalo různé anomálie v ultrastruktuře chloroplastů, peroxisomů a mitochondrií (Synková et al. 2003). Ameboidní tvar chloroplastů byl často pozorován ve spojitosti s přítomností periferního retikula a méně obvyklým vzájemným postavením jednotlivých organel. Výrazné krystalické struktury v chloroplastech jsou s největší pravděpodobností agregáty proteinů světlosběrného komplexu. Další krystalické struktury, častěji pozorované v peroxisomech transgenního tabáku, jsou tvořeny především katalázou (Kleff et al. 1997).

Hlavním cílem naší práce byla 3D rekonstrukce jednotlivých organel a krystalických struktur, která by umožnila zjištění skutečného tvaru a velikosti těchto struktur, eventuálně vzájemného postavení organel. Jako kontrolní tabák byl použit *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1. Transformovaný *Pssu-ipt* tabák, s *ipt* genem pod promotorem pro malou podjednotku RuBPCO, byl pěstován jako roubovaný (G) nebo jako pravokořený (SE, F1 generace) (Synková et al. 1999). Dále byl studován transformovaný tabák cv. Wisconsin 38, *P_{SAG12}-ipt*, kde je *ipt* gen pod kontrolou senescence specifického promotoru. Všechny rostliny byly pěstovány v půdě ve skleníku. Vzorky listů byly fixovány (glutaraldehyd - paraformaldehyd/ OsO_4), odvodněny v acetonu a zality do prykyřice (Spurr). Ultratenké řezy (75 nm tlusté) byly kontrastovány uranylacetátem a citrátem olova a zkoumány v transmisním elektronovém mikroskopu JEM 1010 (Jeol, Japan). Obrazy ze sériových řezů (asi 30 – 50 řezů) byly použity pro 3D rekonstrukci pomocí počítačového programu IMOD 2.42.

Velké krystalické struktury, pozorované v chloroplastech transgenního tabáku, byly zjištěny ve všech fázích vývoje rostliny, zatímco u kontrolního tabáku jen zřídka a to ve fázi pokročilé senescence. 3D rekonstrukce prokázala, že krystaloidy se liší velikostí a zaujímají 8 až 20 % celkového objemu zkoumané části chloroplastu. Mají většinou tvar různě silné desky s různou orientací uvnitř chloroplastu. Krystaloidy z *P_{SAG12}-ipt* jsou obvykle menší než z *Pssu-ipt*.

Rekonstrukce améboidních chloroplastů s periferním retikulem prokázala, že mitochondrie nebo i peroxisomy jsou chyceny uvnitř prostor, tvořených obalovou membránou chloroplastu. Toto postavení zřejmě umožňuje lepší komunikaci a výměnu substrátů mezi organelami.

Obr. 1. 3D rekonstrukce chloroplastu z transgenního *Pssu-ipt* tabáku. šedá = chloroplast, světle šedá s čárkami = krystaloid, tmavě šedá s čárkami = volný prostor kolem krystaloidu.



3D rekonstrukce peroxisomálních krystalů ukázala, že katalázové krystaly zaujímají většinu vnitřního prostoru organely a mají pravidelný tvar kostky.

Přítomnost anomálií v ultrastruktuře organel transgenního tabáku se zvýšeným obsahem cytokininů je zřejmě způsobena přímo či nepřímo stresem, který nadprodukce hormonů vyvolává.

Kleff S, Sander S, Mielke G, Eising R (1997). Eur. J. Biochem. 245, 402-410.

Synková H, Van Loven K, Posišilová J, Valcke R (1999). J. Plant Physiol. 155, 173-182.

Synková H, Pechová, R., Valcke, R. (2003). Photosynthetica. 41(1), 117-126.

Práce byla podporována grantem GA ČR č. 206/01/1061.

Využití dvourozměrné fluorescenční spektroskopie pro stanovení množství a viability buněk tabáku

RADOMÍRA VAŇKOVÁ, ALENA GAUDINOVÁ

Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Rozvojová 2/135, 165 02 Praha 6

e-mail: yankova@ueb.cas.cz

Viz Biologické listy, 2003, 68 (3): 250

Rostlinné esterasy jako vhodný marker pro konstrukci růstové křivky

JAN VÍTEČEK¹, RENÉ KIZEK², JIŘÍ PETŘEK¹, LADISLAV HAVEL¹

¹ Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

Tel.: +420 545 133 342, e-mail: vitecek@mendelu.cz

Růstová křivka suspenzní kultury představuje v biotechnologických aplikacích klíčový parametr. Pro její konstrukci se velmi často používá sledování svěží hmotnosti nebo sušiny. Tento způsob je ovšem mnohdy nevýhodný kvůli nutnosti sklídit dostatečně velké množství kultury. Alternativou může být přímé mikroskopické počítání buněk prostřednictvím počítačící komůrky. Tato technika je však časově náročná, vykazuje značnou experimentální chybu a v některých případech ji nelze realizovat kvůli vzniku velkých shluků buněk. Další metody jako např. optická hustota a sedimentační charakteristiky nejsou pro stanovení růstové křivky vždy vhodné neboť v průběhu kultivační doby dochází ke značným změnám morfologie buněk.

Využití intracelulárních esteras jako markeru buněčné životaschopnosti je známo již delší dobu. Kromě toho novější práce naznačují, že aktivita intracelulárních esteras v dané kultuře závisí pouze na počtu životaschopných buněk. Proto lze intracelulární esterasy využít jako marker pro konstrukci růstové křivky.

Hlavním cílem naší práce bylo vyvinout experimentálně nenáročnou metodu stanovení aktivity intracelulárních esteras v rostlinné suspenzní kultuře. Pro tyto účely jsme použili buněčnou suspenzi tabáku (linie BY-2) a dva substráty vhodné pro esterasy: 4-nitrofenylacetát a fluoresceindiacetát. Esterasy štěpí 4-nitrofenylacetát za vzniku barevného produktu – 4-nitrofenolu, který lze detekovat spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm. Tento postup nevyžaduje nákladné laboratorní vybavení. Dosažená citlivost metody je však nižší než při použití fluoresceindiacetátu, který při štěpení esterasami poskytuje produkt detekovatelný spektrofluorimetricky ($\lambda_{\text{excitace}}$ 490 nm a λ_{emise} 514 nm). Druhý zmíněný postup umožňuje stanovit aktivitu esteras v malém množství biologického materiálu.

Literatura

- Baudouin E., Charpentreau M., Roby D., Marco Y., Ranjeva R., Ranty B.: 2003 - Euro. J. Biochem. 248: 700-706
Choi Y.-J., Lee B. H.: 2001 - Bioprocess. Biosys. Engin. 24: 59-63
Amano T., Hirasawa K., O'Donohue M. J., Pernole J.-C., Shioi Y.: 2003 - Anal. Biochem 314: 1-7
Steward N., Martin R., Engasser J. M., Goergen J. L.: 1999 - Plant Cell Reports 19: 171-176
Brezillon C., Kroon P.A., Faulds C.B., Brett G.M., Williamson G.: 1996 - Appl. Microbiol. Biotechnol 45: 371-376
www.sigma-aldrich.com (25.2.2003)

Tato práce byla podporována grantem FRVŠ č. 1203/2003 a Národním výzkumným centrem: Signální dráhy u rostlin (LN00A081).

Elektrochemické stanovení metalothioneinu a fytochelatinu

RENÉ KIZEK¹, BOŘIVOJ KLEJDUS¹, JAN VACEK¹, JAN VÍTEČEK², VOJTĚCH ADAM¹, LIBUŠE TRNKOVÁ³, LADISLAV HAVEL², VLASTIMIL KUBÁŇ¹

¹Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, CZ-611 37 Brno

²Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, CZ-611 37 Brno

³Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy university, Kotlářská 2, CZ-611 37 Brno

Metalothioneiny (MT) patří do skupiny proteinů, které odpovídají za regulaci fyziologické koncentrace těžkých a esenciálních kovů. Objev MT je datován rokem 1957, kdy Margoshes a Vallee izolovali z koňských ledvin nízkomolekulární protein, který vykazoval vysokou afinitu k iontům kadmia. Rostlinné peptidy (fytochelatiny), schopné vázat ionty kovů, popsal Grill, Winnacker a Zenk v roce 1985 u *Rauwolfia serpentina*.

Elektrochemické metody, jako je voltametrie (DPV) nebo chronopotenciometrie (CPSA), umožňují stanovení velmi nízké koncentrace MT. Vzhledem k výhodám, která elektrochemické metody přináší, se elektroanalýza stala běžně používanou pro studium fyziologických koncentrací MT. Jednou z předností je časová nenáročnost stanovení MT a snadná příprava vzorku, na rozdíl od imunologických technik nebo metod založených na radioaktivním značení. Aplikací adsorptivní přenosové rozpouštěcí (AdTS) techniky je možné provádět analýzu ve vzorcích o objemu 5 µl, což žádná stávající metoda neumožňuje. Každá analytická metoda má nejen své klady, ale i nežádoucí vlastnosti. Jedním z omezení elektrochemie je fakt, že není možné ve vzorku tkáně determinovat jednotlivé isoformy a že může docházet při stanovení k interferencím se sloučeninami obsaženými ve vzorku (např. povrchově aktivní látky, složky pufrů atd.). Jednou z výhod elektroanalýzy MT je možnost stanovení vzorku opakovat protože nedochází k jeho degradaci, jako je tomu např. u atomové absorpční spektrometrie, což umožňuje studium kinetiky vazby iontů do vazebných domén MT. Budoucnost vývoje elektroanalytických metod pro stanovení MT v biologickém vzorku se skýtá v použití elektrochemie v multidimenzionální analýze a v technologii biosenzorů.

V naší práci jsme se zabývali stanovením metalothioneinu a fytochelatinu pomocí chronopotenciometrie s konstantním proudem a cyklické voltametrie.

Kägi J. H. R., Kojima Y.: 1987 - *Experientia*. Suppl. 52, 25

Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H.: 1985 - *Science* 320, 674

Šestáková I., Mader P.: 2000 - *Cell. Mol. Biol.* 46, 257

Trnková L., Kizek R., Vacek J.: 2002 - *Bioelectrochemistry* 56, 57

Kizek R., Trnková L., Paleček E.: 2001 - *Anal. Chem.* 73, 4801

Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnková L., Němec M.: 2003 - *Bioelectrochemistry* 60, 29

Práce na této publikaci byla financována z grantu FRVŠ č. 1203/2003 a dlouhodobého záměru Agronomické fakulty MZLU č. 4321 0000 a Národním výzkumným centrem: Signální dráhy u rostlin (LN00A081).

Izolace chloroplastů tabáku a jejich imobilizace do Ca-alginátu

LENKA VÍTOVÁ^{1,2}, ANNA VIČÁNKOVÁ¹, PETRE DOBREV¹, IVANA MACHÁČKOVÁ¹, RADOMÍRA VAŇKOVÁ¹

¹ÚEB AVČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, ČR; ² Katedra fyziologie rostlin PřF UK Viničná 5, 128 43 Praha, ČR

Tel.: 220390418, e-mail: vitova@ueb.cas.cz

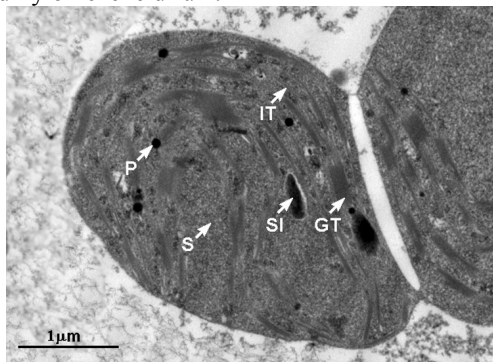
Studium metabolismu izolovaných chloroplastů je značně omezeno jejich nízkou stabilitou při pokojové teplotě (úplná dezintegrace nastává do 7 hodin). Prodloužit životnost izolovaných intaktních chloroplastů jsme se pokusili jejich imobilizací. Zapouzdření do vhodné gelové matrice může mít ochranné účinky, protože umožňuje vytvářet příznivé mikrookolí a snižuje negativní mechanické vlivy, např. síly střížného napětí. Stabilizující matrice ovšem současně vytváří difúzní bariéry, zejména pro transport živin a kyslíku (Guiseley, 1989). V závislosti na typu a koncentraci použitého polymeru a typu buněk může mít imobilizace pozitivní i negativní vliv (např. na rychlost růstu mikrobiálních buněk; Junter *et al.* 2002).

Chloroplasty jsou velmi zřídka používány k imobilizaci, zřejmě díky své křehkosti. Fotochemické aktivity byly porovnávány u chloroplastů volných a imobilizovaných do různých matric (do agaru, Ca-alginátu a glutaraldehydu zesítěného BSA) (Synková a Šesták, 1991). V jiné studii byly použity chloroplasty vázané do Ca-alginátových „kapek“ pro studium přenosu lyzofosfatidylcholinu z mikrozomů v alginátových částicích a následného metabolismu lyzolidů (Testet *et al.*, 1999). Vlivu imobilizace na fyziologii a strukturu chloroplastů bylo zatím věnováno jen málo pozornosti. Autoři se omezují pouze na slovní popis strukturálních změn („leakage of stroma“ – vytékání stromatu; Testet *et al.*, 1999) bez obrazové dokumentace.

Vliv imobilizace na chloroplasty jsme charakterizovali na základě těchto kritérií:

- 1) životnost (měřením aktivity glyceraldehydfosfátdehydrogenázy – markeru intaktnosti chloroplastů),
- 2) ultrastruktura (pomocí transmisní elektronové mikroskopie, viz obr. 1),
- 3) metabolismus rostlinných hormonů cytokininů.

Jako materiál jsme používali intaktní chloroplasty izolované z kontrolních rostlin tabáku a rostlin transformovaných genem *Zm-p60.1* kódujícím β -glukozidázu směřovanou do plastidů pod kontrolou konstitutivního promotoru CaMV 35S. Tento enzym uvolňuje z cytokinin-O-glukozidů volné báze (aktivní formy cytokininů). Izolace a následná imobilizace chloroplastů do nízkoviskózního alginátu způsobila změny v ultrastruktuře chloroplastů, které se zvětšovaly s prodlužující se dobou inkubace (zejména dilatace tylakoidního systému). Výhodou imobilizace chloroplastů je podstatně snazší manipulace při přípravě vzorků v porovnání s chloroplasty v suspenzi např. pro elektronovou mikroskopii. Metabolismus cytokininů byl v chloroplastech sledován pomocí exogenních radioaktivně značených substrátů (zeatin, zeatin-O-glukozid). HPLC analýza ukázala, že spektrum značených metabolitů je v případě volných a imobilizovaných chloroplastů velmi podobné. Nicméně výsledky naznačují, že imobilizované chloroplasty jsou v porovnání s volnými méně metabolicky aktivní, pravděpodobně díky omezené difúzi.



Obr. 1: Transmisní elektronový mikrosnímek příčného řezu chloroplasty tabáku (GT – granální tylakoidy, IT – intergranální tylakoidy, SI – škrobové inkluze, P - plastoglobule, S – stroma).

Guiseley K. B.: 1989 - Enzyme Microbial. Technol. 11 (11): 706-716

Junter G. A., Coquet L., Vilain S., Jouenne T.: 2002 - Enzyme Microbial. Technol. 31 (3): 201-212

Synková H., Šesták Z.: 1991 - Photosynthetica 25(1) : 1-10

Testet E., Verdoni N., Cassagne C., Bessoule J.: 1999 - Biochimica et Biophysica Acta 1440: 73-80

Podporováno granty GA ČR 206/03/0369 a MŠMT COST OC 840.20 a LN00A081.

REJSTŘÍK AUTORŮ

ADAM.....	74	KOMÁREK.....	8
ALKHIMOVA.....	52	KOMENDA.....	54
BARÁNEK.....	63	KOVAŘÍK.....	12, 39, 39
BARTOŠ.....	32, 41, 56	KOVÁŘOVÁ.....	32, 41, 56
BAVLNKA.....	37	KUBALÁKOVÁ.....	32, 41, 56
BRZOBOHATÝ.....	22, 23	KUBÁŇ.....	74
CVRČKOVÁ.....	16	KUBÍNOVÁ.....	42
ČAPKOVÁ.....	24, 38	KUČERA.....	57, 66, 67
ČEŘOVSKÁ.....	48, 64	KUCHAŘÍKOVÁ.....	58
ČÍHALÍKOVÁ.....	32, 41, 56	KUNICKÁ.....	55
DIFATO.....	42	KYPR.....	10
DOBEŠOVÁ.....	23	LAURIE.....	69
DOBREV.....	49, 75	LEBEDA.....	45
DOLEŽEL.....	32, 41, 52, 56, 70	LEIŠOVÁ.....	57, 59, 67
DOLEŽELOVÁ.....	52	LENGEROVÁ.....	60
DOUBNEROVÁ.....	64	LICHTSCHEIDL.....	44
EICHACKER.....	54	LINEK.....	61
ELIÁŠOVÁ.....	35	LUHOVÁ.....	45
FAJKUS.....	29	MACAS.....	17
FISCHER.....	14	MACHÁČKOVÁ.....	75
FIŠER.....	20	MARKOVÁ.....	62
FOJTA.....	58, 65	MARTINEC.....	61, 68
FOJTOVÁ.....	31	MATYÁŠEK.....	39, 39
FULNEČEK.....	27	MINAŘÍKOVÁ.....	59
GAUDINOVÁ.....	72	MLÍČKOVÁ.....	45
HÁJEK.....	38	MORAVCOVÁ.....	63
HALÁMKOVÁ.....	50	MORAVEC.....	48
HAVEL.....	73, 74	MULLER.....	64
HEJÁTKO.....	23	NĚMCOVÁ.....	65
HOBZA.....	33	NEPLECHOVÁ.....	29
HONYS.....	18	NOVOTNÁ.....	61
HORÁK.....	23	OPATRŇY.....	25
HOZÁK.....	43	OVEČKA.....	44
HŘIBOVÁ.....	52	OVESNÁ.....	57, 59, 66, 67
HYKELOVÁ.....	33	PAČES.....	9
HYNEK.....	61	PATZAK.....	68
ILLÉŠ.....	44	PEČ.....	45
JANÁČEK.....	42	PEČENKOVÁ.....	48
JANDA.....	32, 41	PEČINKA.....	70
KADLECOVÁ.....	11	PECHOVÁ.....	71
KAMÍNEK.....	49	PEJCHAR.....	68
KARBULKOVÁ.....	46	PERNISOVÁ.....	23
KAREN.....	42	PETRÁŠEK.....	25
KEJNOVSKÁ.....	53	PETŘEK.....	73
KEJNOVSKÝ.....	53	PÍCKOVÁ.....	13
KIZEK.....	73, 74	PIDRA.....	63
KLEJDUS.....	74	PIVOŇKOVÁ.....	58, 65

POLÁKOVÁ	57, 67, 69	ŠIMKOVÁ	32, 41, 46
POTOCKÝ	15, 61	ŠTORCHOVÁ	28
RADOCHOVÁ	42	TOMANCOVÁ	34
REISINGER	54	TRNKOVÁ	74
REŇÁK	19	TWELL	18
RYŠLAVÁ	64	VACEK	74
SEDLÁŘOVÁ	45	VALÁRIK	32, 41
SCHRAML	40	VALENTOVÁ	61, 68
SCHREIBER	46	VAŇKOVÁ	72, 75
SKALICKÁ	39, 39	VELEMÍNSKÝ	48
SOUKUPOVÁ	13	VIČÁNKOVÁ	75
SUCHÁNKOVÁ	70	VÍTEČEK	73, 74
SÝKOROVÁ	29	VÍTOVÁ	75
SYNKOVÁ	48, 71	VYSKOT	21
ŠAFÁŘ	32, 41, 52	WEISER	36
ŠANTRŮČEK	46	WILDOVÁ	66
ŠEBO	26	ZÁMEČNÍK	66
ŠIMÁŇOVÁ	46	ZAŽÍMALOVÁ	25

SEZNAM ÚČASTNÍKŮ

Bartoš Jan, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 tel.: 58 522 8521, email: bartos@ueb.cas.cz
Bavlnka Břetislav, Mgr.	Katedra fyziologie rostlin PřF UK Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 220 390 449, email: bavlnka@ueb.cas.cz
Bláha Ladislav, ing, CSc.	Výzkumný ústav rostlinné výroby Drnovská 507, Praha 6, Ruzyně, 161 06 tel.: 2 330 22 448, email: blaha@vurv.cz
Boříková Petra, Mgr.	Katedra fyziologie rostlin, Př. f. UK Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 221951692, email: petborik@natur.cuni.cz
Brzobohatý Břetislav, RNDr., CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 61265 tel.: 541517184, email: brzoboha@ibp.cz
Burketová Lenka, Ing.	ÚEB AV ČR Na Karlovce 1a, Praha 6, 16000 tel.: 224 310 108, email: burketova@ueb.cas.cz
Cvikrová Milena, RNDr.	ÚEB AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220 390 409, email: cvikrova@ueb.cas.cz
Cvrčková Fatima, Dr.	Přírodovědecká fakulta UK, Praha, katedra fyziologie rostlin Viničná 5, Praha 2, 12844 tel.: 221951685, email: fatima@natur.cuni.cz
Čeřovská Noemi, RNDr.	UEB AV ČR Na Karlovce 1, Praha 6, 160 00 tel.: 233320338, email: cerovska@ueb.cas.cz
Dobrev Petre Ivanov, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: +420 2 20390444, email: dobrev@ueb.cas.cz
Eliášová Hana, RNDr.	Kriminalistický ústav PČR pošt. schr. 62/KÚP, Strojnická 27, Praha 7, 170 89 tel.: 974 824 500, email: hanaeliasova@atlas.cz
Feltl Tomáš, Mgr.	Gymnázium Vincence Makovského Leandra Čecha 152, Nové Město na Moravě, 592 31 tel.: 566 616 460, email: tomas.feltl@gym.nmmn.cz
Fischer Jan, Doc.	Fyzikální ústav AV ČR Na Slovance 2, Praha 6, 182 21 tel.: +420 266 053 11, email: fischer@fzu.cz
Fojtová Miloslava, Mgr. CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541517230, email: fojtova@ibp.cz
Fulneček Jaroslav, Mgr., CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541517230, email: fulnecek@ibp.cz

Hájek Tomáš, Mgr.	Ústav experimentální botaniky Rozvojová 135, Praha , 165 02 tel.: 220390451, email: hajtom@ueb.cas.cz
Halámková Eva, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 tel.: 5852228521, email: halamkova@ueb.cas.cz
Havelková Lenka, Mgr.	UK, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie rostlin Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 605227676, email: hav@vol.cz
Hejátko Jan, RNDr.	Biofyzikální ústav AVČR Královopolská 135, Brno, 612 62 tel.: 541 129 368, email: hejatk@sci.muni.cz
Herbstová Miroslava	Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK Albertov 2030, Praha, 128 43 tel.: 221 951 276 , email: mirka.h@ladymail.cz
Hobza Roman, Mgr.	BFÚ AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 203, email: hobza@ibp.cz
Honys David, RNDr.	ÚEB AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220390450, email: honys@ueb.cas.cz
Horáček Jiří, Ph.D.	AGRITEC s.r.o. Zemědělská 16, Šumperk, 787 01 tel.: 583 382 139, email: horacek@agritec.cz
Horáčková Martina, Mgr.	Katedra fyz. rostlin, PřF UK, Viničná 5, Praha, 128 43 tel.: 220390449, email: maho@natur.cuni.cz
Hozák Pavel, Doc.	Ústav experimentální medicíny AV ČR Videňská 1083, Praha 4 Krč, 142 20 tel.: 241062219, email: hozak@biomed.cas.cz
Hřibová Eva, Mgr.	ÚEB AV ČR Sokolovská 6, Olomouc, 77200 tel.: 585 228 521, email: hribova@ueb.cas.cz
Hýblová Jana, Ing.	Ústav organické chemie a biochemie AV ČR Flemingovo nám. 2, Praha 6, 16610 tel.: 220 01 83 470, email: jana.hyblova@centrum.cz
Hykelová Vladimíra, Mgr.	BFÚ AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 203, email: hykelova@yahoo.fr
Chadová Jitka, Ing.	ÚKZÚZ Za Opravnou 4, Praha 5, 150 06 tel.: 2 572 94 220, email: jitka.chadova@ukzuz.cz
Illéš Peter, Mgr.	Botanický ústav SAV Dúbravská cesta 14, Bratislava, 84523 tel.: 00421259426102, email: peter.illes@savba.sk
Jalč Patrik, Mgr.	Agronomická fakulta ČZU v Praze Kamýcká 957, Praha 6 - Suchbátka, 165 21 tel.: 224 382 717, email: zazimalova@ueb.cas.cz
Janda Jaroslav, Mgr.	ÚEB AV ČR Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 tel.: 58 522 8521, email: janda@ueb.cas.cz

Kadlecová Ivana, PhDr.	Knihovna AV ČR Národní 3, Praha 1, 11522 tel.: 2 24240524, email: kadlec@lib.cas.cz
Kalousek Petr, Ing.	MZLU Zemědělská 1, Brno, 61300 tel.: 545133188, email: Kal.petr@seznam.cz
Kejnovská Iva, RNDr.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 123, email: kejnovska@ibp.cz
Kejnovský Eduard, RNDr.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 194, email: kejnovsk@ibp.cz
Klíma Petr, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AVČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220 390 429, email: petr.klima@centrum.cz
Kolář Jan, Mgr.	Ústav experimentální botaniky Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 608 557 328, email: kolar@ueb.cas.cz
Komárek Stanislav, Prof.	PřF UK, Katedra zoologie, Viničná 7, 128 44 Praha 2 Tel.: 221 953 208, e-mail: komarek@natur.cuni.cz
Komenda Josef, RNDr.	MBÚ AV ČR Opatovický mlýn, Třeboň, 37981 tel.: 384 721101, email: komenda@alga.cz
Kosová Klára	PřF UK, kat. fyziologie rostlin Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 221 951 700, email: kosovk@post.cz
Kovařík Aleš, RNDr.	Biofyzikální ústav AVČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541517178, email: kovarik@ibp.cz
Kovářová Pavlína, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 tel.: 58 522 8521, email: kovarova@ueb.cas.cz
Křeček Pavel, Mgr.	Přírodovědecká fakulta UK Albertov 6, Praha 2, 128 43 tel.: 22195 1692, email: krecek1@prfdec.natur.cuni.cz
Kubínová Lucie, RNDr., CSc.	Fyziologický ústav Videňská 1083, Praha 4, 14220 tel.: 241062314, email: kubinova@biomed.cas.cz
Kučera Ladislav, Ing.	Výzkumný ústav rostlinné výroby Drnovská 507, Praha, 161 06 tel.: 233022247, email: kuceral@vurv.cz
Kuchaříková Kateřina, Mgr.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541517197, email: katka@ibp.cz
Kunická Zuzana, Ing.	Lab. FGP - ABVMK Kotlářská 2, BRNO, 61137 tel.: 541517151, email: kunicka@ibp.cz

Kuthanová Andrea, Mgr.	Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta, UK Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 221951695, email: azelena@natur.cuni.cz
Kuviková Stanislava, Ing.	MBÚ AV ČR Opatovický Mlýn, Třeboň, 37981 tel.: 384 721101, email: kuvikova@alga.cz
Kypr Jaroslav, RNDr, CSc.	Biofyzikální ústav AVČR Královopolská 135, Brno, 61265 tel.: 541517198, email: kypr@ibp.cz
Laňková Martina, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220 390 429, email: martina.lankova@seznam.cz
Leišová Leona, Mgr.	Výzkumný ústav rostlinné výroby Drnovská 507, Praha, 161 06 tel.: 233022245, email: leisova@vurv.cz
Lengerová Martina, Mgr.	BFÚ AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 203, email: lengerova@ibp.cz
Libus Jiří, RNDr.	ÚEB AV ČR Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00 tel.: 604796329, email: libus@ueb.cas.cz
Linek Jan, Ing.	Vysoká škola chemicko-technologická, ÚBM Technická 5, Praha 6, 160 00 tel.: 224353017, email: linekj@vscht.cz
Lízal Pavel, RNDr.	PřF Masarykovy univerzity, Katedra genetiky a molekulární biologie Kotlářská 2, Brno, 611 37 tel.: 541129617, email: lizal@sci.muni.cz
Macas Jiri, Dr.	Ústav molekulární biologie rostlin, AVČR Branišovská 31, České Budějovice, 37005 tel.: 38 7775513, email: macas@umbr.cas.cz
Macháčková Ivana, Dr.	ÚEB AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220390453, email: machackova@ueb.cas.cz
Malá Jana, RNDr.,CSc.	VÚLHM Strnady, Praha- Zbraslav, 156 04 tel.: 2577920681, email: mala@vulhm.cz
Marková Michaela	BFÚ AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 203, email: m.markova@email.cz
Martinec Jan, RNDr., CSc.	ÚEB AVČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220390416, email: martinec@ueb.cas.cz
Matušková Petra, Ing.	MZLU Zemědělská 1, Brno, 613 00 tel.: 545133188, email: petra.matuskova@email.cz
Matyášek Roman, RNDr., CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541517230, email: matyasek@ibp.cz
Mličková Kateřina, Mgr.	Katedra botaniky PřF UP Olomouc Šlechtitelů 11, Olomouc-Holice, 78371 tel.: +420585634925, email: katrynka@email.cz

Mokroš Petr, Mgr.	BFÚ AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541517204, email: lengerova@ibp.cz
Moravcová Kateřina, Ing.	MZLU, Zahradnická fakulta Valtická, 433, Lednice, 69144 tel.: 519367313, email: xmoravc2@node.mendelu.cz
Motyka Václav, Ing, CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220390437, email: vmotyka@ueb.cas.cz
Muller Karel, Ing.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, Praha 2, 128 43 tel.: 221951282, email: caia@volny.cz
Navrátilová Alice, Mgr.	Ústav molekulární biologie rostlin, AV ČR Branišovská 31, České Budějovice, 370 05 tel.: 387775516, email: navratil@umbr.cas.cz
Němcová Kateřina	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 61265 tel.: 541 517 197, email: 52458@mail.muni.cz
Neumann Pavel	Ústav Molekulární Biologie Rostlin Branišovská 31, České Budějovice, 37005 tel.: 387775511, email: neumann@umbr.cas.cz
Nováková Slavomíra, Ing.	Virologický ústav SAV Dúbravská cesta 9, Bratislava, 842 45 tel.: 00421259302447, email: snovakova@pobox.sk
Nováková Marie, Mgr.	ÚEB Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220 390 426, email: marie_novakova@email.cz
Novotná Zuzana, Dr.Ing.	VŠCHT- FPBT Ústav biochemie a mikrobiologie Technická 3, Praha 6, 161 00 tel.: 224355102, email: zuzana.novotna@vscht.cz
Opatrná Jana, RNDr. CSc.	UEB AVČR Rozvojová 135, Praha 6, 16502 tel.: 220390422, email: opatrna@ueb.cas.cz
Opatrný Zdeněk, Prof.Dr.	Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta Viničná 5, Praha 2, 12844 tel.: 2 2195 1690, email: opat@natur.cuni.cz
Ovesná Jaroslava, RNDr.	Výzkumný ústav rostlinné výroby Drnovská 507, Praha, 161 06 tel.: 233022424, email: ovesna@vurv.cz
Pačes Jan, Mgr. PhD.	Ústav molekulární genetiky AVČR Flemingovo nám. 2, Praha, 16637 tel.: 220183446, email: hpaces@img.cas.cz
Pánková Kateřina, Mgr.	Výzkumný ústav rostlinné výroby Drnovská 507, Praha 6, 161 06 tel.: 233 022 390, email: k.pankova@vurv.cz
Patzak Josef, Ing. PhD.	Chmelařský institut, s.r.o. Kadaňská 2525, Žatec, 43846 tel.: 415732109, email: j.patzak@telecom.cz
Pechová Renáta, Mgr.	ÚEB AV ČR Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00 tel.: 233320338, email: pechova@ueb.cas.cz

Pejchar Přemysl, Ing.	Ústav experimentální botaniky, AVČR Rozvojová 135, Praha 6, 16502 tel.: 296780420, email: pejchar@ueb.cas.cz
Petrášek Jan, RNDr.	Katedra fyziologie rostlin PřFUK Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 221951692, email: petrasek@ueb.cas.cz
Picková Denisa, Mgr.	Katedra fyziologie rostlin PřF UK Viničná 7, Praha 2, 128 44 tel.: 220 390 449, email: pickova@ueb.cas.cz
Pokorná Jindřiška, Mgr.	Přírodovědecká fakulta UK Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 221 951 616, email: jindruch@natur.cuni.cz
Poláková Kateřina, Mgr.	Výzkumný ústav rostlinné výroby Drnovská 507, Praha, 161 06 tel.: 233022330, email: katerina.polakova@vurv.cz
Pospíšková Markéta, Mgr.	VÚKOZ Květnové nám., Průhonice, 252 43 tel.: 296528375, email: pospiskova@vukoz.cz
Potocký Martin, Ing.	Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha Technická 5, Praha 6, 166 28 tel.: 22435 3017, email: potockym@vscht.cz
Prášil Ilja, RNDr., CSc.	Výzkumný ústav rostlinné výroby Drnovská 507, Praha 6, 161 06 tel.: 233022440, email: Prasil@vurv.cz
Ptáček Jiří, RNDr.	Výzkumný ústav bramborářský Dobrovského 2366, Havlíčkův Brod, 58001 tel.: 569466231, email: ptacek@vubhb.cz
Reňák David, Mgr.	ÚEB AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 16502 tel.: 220390451, email: d.renak@seznam.cz
Sedlářová Michaela, RNDr., PhD.	Katedra botaniky PřF UP Olomouc Šlechtitelů 11, Olomouc-Holice, 78371 tel.: +420585634804, email: sedlarova@prfholnt.upol.cz
Seifertová Daniela, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220390431, email: danielaseifert@yahoo.de
Schraml Jan, Doc., Dr.	Ústav chemických procesů AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220 390 315, email: schraml@icpf.cas.cz
Schwarzerová Kateřina, Mgr.	Katedra fyziologie rostlin Př.f. UK Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 221951692, email: schwarze@natur.cuni.cz
Skalická Kamila, Mgr.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 61265 tel.: 541517179, email: skalicka@ibp.cz
Skůpa Petr, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220 390 429, email: zazimalova@ueb.cas.cz
Sobotka Roman, PhD.	Mikrobiologický Ústav AV ČR Opatovický Mlyn, Třeboň, 37901 tel.: 384722268, email: sobotka@alga.cz

Sofrová Danuše, Prof., RNDr., CSc.	Přírodovědecká fakulta Albertov 2030, Praha, 128 43 tel.: 221 951 276, email: sofrova@natur.cuni.cz
Suchánková Pavla, Mgr.	ÚEB AV ČR Sokolovská 6, Olomouc, 77200 tel.: 585 228 521, email: suchankova@ueb.cas.cz
Sýkorová Eva	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 61265 tel.: 541517199, email: evin@ibp.cz
Synková Helena, RNDr., CSc.	ÚEB AV ČR Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00 tel.: 233320338, email: synkova@ueb.cas.cz
Šebo Petr, Ing.	MBÚ AV ČR Videňská 1083, Praha 4, 14000 tel.: 4106 2762, email: sebo@biomed.cas.cz
Šedivá Jana, Ing.	Výzkumný ústav S. Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví Květnové náměstí 391, Průhonice, 252 43 tel.: 296528315, email: sediva@vukoz.cz
Šimáňová Eva, Mgr.	Botanical Institute, University of Bonn Kirschallee 1, Bonn, Germany, 531 15 tel.: 0049-228-734757, email: simanova@uni-bonn.de
Štajnrtová Olga	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220 390 416, email: stajnrtova@ueb.cas.cz
Štillerová Kateřina, Ing.	UEB AV ČR a ČZU Na Karlovce 1a, Praha 6, 16000 tel.: 224 310 109, email: stillerova@ueb.cas.cz
Štorchová Helena, Dr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6 - Lysolaje, 165 00 tel.: 220 390 433, email: storchova@ueb.cas.cz
Šubr Zdeno, RNDr., CSc.	Virologický ústav SAV Dúbravská cesta 9, Bratislava, 84505 tel.: 00421259302447, email: virusubr@savba.sk
Tichá Ingrid, Doc. RNDr. CSc.	PřF UK, kat. fyziologie rostlin Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 221 951 683, email: iticha@natur.cuni.cz
Tomancová Jarmila, Ing.	Policie ČR - Kriminalistický ústav Praha pošt. schránka 62/KÚP, Praha 7, 170 89 tel.: 974 824 501, email: jarmilatomancova@hotmail.com
Valentová Olga, Doc. RNDr.	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Technická 3, Praha 6, 166 28 tel.: 224355102, email: olga.valentova@vscht.cz
Vaňková Radomíra, RNDr.	ÚEB AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 220 390 427, email: vankova@ueb.cas.cz
Věchet Lubomír, Ing., CSc.	Výzkumný ústav rostlinné výroby Drnovská 507, Praha 6 - Ruzyně, 161 06 tel.: 233 022 361, email: vechet@vurv.cz
Větrovcová Martina, Ing.	AGRITEC s.r.o. Zemědělská 16, Šumperk, 787 01 tel.: 583 382 136, email: vetrovcova@agritec.cz

Víteček Jan, Mgr.	Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, MZLU Zemědělská 1, Brno, 613 00 tel.: 545 133 342 , email: vitecek@mendelu.cz
Vítová Lenka, Mgr.	ÚEB AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 00 tel.: 220390418, email: vitova@ueb.cas.cz
Vlasáková Eva, Ing.	VÚRV Drnovská 507, Praha 6, 161 06 tel.: 233 022 443, email: vlasakova@vurv.cz
Vyskot Boris, Prof.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541-240-500, email: vyskot@ibp.cz
Weiser Jaroslav, RNDr. CSc.	Mikrobiologický ústav AV ČR Videňská 1083, Praha 4, 14220 tel.: 241 062 378, email: weiser@biomed.cas.cz
Wolf Karel, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AVCR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: +420-220390431, email: wolf@ueb.cas.cz
Zápotocký Luboš, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6 , 160 00 tel.: 220390452, email: zapotocky@ueb.cas.cz
Zelenková Sylva, RNDr., CSc.	PřF UK, katedra fyziologie rostlin Viničná 5, Praha 2, 128 44 tel.: 221951692, email: zelen@natur.cuni.cz
Zima Jan, RNDr., CSc.	Chromspec s.r.o. Lhotecká 594, Mníšek pod Brdy, 252 10 tel.: 318 599 083, email: zimachromspec@vol.cz
Žďárová Štěpánka, Ing.	ÚEB AVČR Rozvojová 135, Praha 6 - Lysolaje, 165 02 tel.: 220390416, email: zdarova@centrum.cz

POZNÁMKOVÝ BLOK